

Aus der Klinik und Poliklinik II – Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

Cannabinoid - 1 Rezeptoren (CB₁) beeinflussen
die Motilität des Dünndarms von Maus und Ratte –
Untersuchungen zum peristaltischen Reflex
und Dünndarmtransit

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität

Vorgelegt von
Birol Yüce
aus
Heidelberg
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München:

Berichtersteller: Prof. Dr. B. Göke

Mitberichtersteller: Prof. Dr. G. Enders
Prof. Dr. M. Siebeck
Prof. Dr. St. Endres

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. M. Storr

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen
Prüfung: 13.10.2005

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	5
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
3	MATERIAL UND METHODEN.....	8
3.1	Peristaltischer Reflex-Dünndarm	8
3.1.1	Versuchstiere.....	8
3.1.2	Versuchsanordnung.....	8
3.1.3	Versuchsdurchführung.....	9
3.1.4	Datenauswertung.....	11
3.1.5	Statistische Auswertung	11
3.2	Elektrophysiologische, intrazelluläre Ableitung.....	13
3.2.1	Versuchstiere.....	13
3.2.2	Versuchsdurchführung.....	13
3.2.3	Versuchsaufbau der intrazellulären Ableitung	13
3.2.4	Datenauswertung.....	15
3.3	Transitversuche.....	17
3.3.1	Versuchstiere.....	17
3.3.2	Versuchsvorbereitung.....	17
3.3.3	Statistische Auswertung	17
3.4	Verwendete Substanzen	18
3.5	Verwendete Geräte	18
4	ERGEBNISSE.....	19
4.1	Peristaltischer Reflex.....	19
4.1.1	Wirkung von Anandamid auf die Kontraktionskraft der ascendierenden exzitatorischen Kontraktion bei Applikation in die Stimulationskammer.....	19
4.1.2	Wirkung von Anandamid auf die Latenz der oralen Kontraktion bei Applikation in die Stimulationskammer.....	21
4.1.3	Wirkung von AM251 auf die Kontraktionskraft der ascendierenden exzitatorischen Kontraktion bei Applikation in die Stimulationskammer.....	23
4.1.4	Wirkung von AM251 auf die Latenz der oralen Kontraktion bei Applikation in die Stimulationskammer	25
4.1.5	Wirkung von Anandamid auf die Höhe und Fläche der ascendierenden Kontraktion bei Applikation in die orale Kammer.....	27
4.1.6	Wirkung von Anandamid auf die Latenz der ascendierenden Kontraktion bei Applikation in die orale Kammer.....	29
4.1.7	Einfluss von AM251 auf die ascendierende Kontraktion bei Applikation in die Ableitungskammer.....	31
4.1.8	Einfluss von AM251 auf die Latenz der ascendierenden Kontraktion bei Applikation in die Ableitungskammer	33

4.2 Intrazelluläre Ableitung der Membranpotentiale der zirkulären Dünndarmmuskulatur an Wildtypmaus und CB₁ -/- Mäusen	35
4.3 Dünndarmtransit der Maus in vivo.....	37
5 ALLGEMEINE DISKUSSION.....	39
5.1 Dünndarm.....	39
5.1.1 Makroskopischer Aufbau	39
5.1.2 Mikroskopischer Aufbau	39
5.2 “Interstitial cells of Cajal”	42
5.2.1 Morphologie von ICC	44
5.3 Neuromuskuläre Interaktion im Gastrointestinaltrakt.....	46
5.4 Motilität des Magen-Darm-Traktes	50
5.5 Der myenterische Reflex.....	50
5.6 Aszendierender exzitatorischer Reflex.....	51
5.7 Cannabinoide	52
5.7.1 Endocannabinoide (Eicannoside)	54
5.7.2 Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten	57
5.7.3 Die Cannabinoidrezeptoren	60
5.7.4 Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten	62
5.7.5 Unerwünschte Wirkung von Cannabinoiden	65
5.7.6 CB ₁ -Knockout-Maus.....	66
6 SPEZIELLE DISKUSSION.....	68
7 ZUSAMMENFASSUNG	78
8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	80
9 TABELLENVERZEICHNIS	83
10 REFERENZEN	85
11 LEBENS LAUF.....	101
12 DANKSAGUNG.....	102

1 EINLEITUNG

Hanf, wissenschaftlich besser bekannt unter dem Namen *Cannabis*, wurde seit mehreren tausend Jahren als Nutz-, Rausch- und Heilpflanze angewendet. Die älteste nachgewiesene therapeutische Verschreibung von *Cannabis* geht auf den Kaiser Shen-Nung im 28. Jahrhundert vor Christus in China zurück; unter diesem wurde er für die Behandlung von Beriberi, Malaria, Gicht und anderen Erkrankungen verschrieben. Seither verbreitete sich die Pflanze nahezu weltweit aus, nach Europa wurde sie vermutlich nach dem Einzug Napoleons in Ägypten 500 nach Christus eingeführt.

Durch den Missbrauch der Pflanze als Droge wurde die Verbreitung zunächst durch das Opiumgesetz von 1929 verboten und schließlich durch das 1971 verabschiedete Betäubungsmittelgesetz weiter verschärft. In den neunziger Jahren wurde die Legalisierung erneut in der Öffentlichkeit diskutiert und endete mit dem vorzeitigen Höhepunkt des straflosen Besitzes zum Eigenkonsum von geringen Mengen Cannabis. Diese breite Diskussion wurde nicht zuletzt durch die medizinischen Wirkungen der Pflanze forciert.

Zu den wichtigsten Inhaltsstoffen der Pflanze gehören die sogenannten Cannabinoide, die für die zahlreichen medizinischen Wirkungen der Pflanze verantwortlich sind. Die Wirkungen werden dabei im Organismus durch spezifische Cannabinoid-Rezeptoren aber auch durch andere Rezeptoren, wie beispielsweise dem Vanilloid-Rezeptor entfaltet. Der Nachweis spezifischer Cannabinoid-Rezeptoren legte die Vermutung nahe, dass körpereigene Liganden existieren, was durch den Nachweis von Anandamid (abgeleitet vom Sanskritwort Ananda = Glückseligkeit) 1992 bewiesen wurde. Neben diesem existieren auch noch weitere körpereigene Liganden (Noladin, 2-AG, Virodhamin, u.a.), die zusammenfassend als Endocannabinoide bezeichnet werden. Dieses körpereigene „Cannabinoid-System“ konnte sowohl in Menschen wie aber auch in verschiedenen anderen Lebewesen nachgewiesen werden, insbesondere auch im Verdauungstrakt von Maus und Ratte. Die physiologischen Wirkungen von exogenen wie auch endogenen Cannabinoide sind aktuell Gegenstand intensiver Forschung in experimentellen und klinischen Studien. Neben dem ZNS scheint unter anderen ein weiterer Wirkort dabei der Magen-Darm-Trakt zu sein, wo die Aktivierung von CB₁-Rezeptoren im wesentlichen einen hemmenden Einfluss auf die Motilität des Darmes und letztendlich der Verdauung zeigt.

Ein einfaches und doch eindrucksvolles Modell, um den Einfluss von Substanzen auf die Motilität des Darmes zu untersuchen, ist der peristaltische Reflex, der erstmals von Bayliss und Starling 1899 beschrieben wurde. Dieser kann sehr gut an isolierten Dünndarmsegmenten *in vitro* dargestellt werden. Die Besonderheit des hier verwendeten Organbades macht es möglich, den peristaltischen Reflex in funktionelle Bereiche zu unterteilen, so dass die Wirkungen der Cannabinoide spezifischer beschrieben werden konnten.

Durch die Zucht von CB₁-Knockout (CB₁^{-/-}) Mäusen, die keine CB₁-Rezeptoren besitzen, ist es möglich, den Einfluss des Endocannabinoidsystems spezifischer zu untersuchen. Sowohl *in vivo* Untersuchungen als auch in elektrophysiologischen Untersuchungen konnte dabei das veränderte Motilitätsmuster der CB₁^{-/-} Maus nachgewiesen werden. Die vorgelegte Doktorarbeit untersucht:

1. den Einfluss des synthetisch hergestellten Endocannabinoids Anandamid und seines Antagonisten AM251 auf die ascendierende Kontraktion des peristaltischen Reflexes.
2. den gastrointestinalen Transit einer Testspeise in CB₁^{-/-} Mäusen im Vergleich zu CB₁^{+/+}-Mäusen
3. die elektrophysiologischen Aktivitätsmuster der glatten zirkulären Muskelzelle der CB₁^{-/-} im Vergleich zu CB₁^{+/+}-Mäusen

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen der Frage nach der physiologischen Bedeutung des Endocannabinoidsystems beitragen, insbesondere ob eine tonische Aktivität im physiologischen Zustand besteht.

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AUC: Area under the curve

AMT: Anandamid Membran Transporter

CB: Cannabinoid

CED: Chronisch entzündliche Darmerkrankung

DNBS: Di-Nitro-Benzol-Sulfat

EFS: Elektrische Feldstimulation

ENS: Enterisches Nervensystem

FAAH: Fatty acid amide hydrolase

GI: Gastrointestinal

GM: glatten Muskelzellen

ICC: Interstitielle Zellen nach Cajal

KRP: Krebs Ringer Puffer

LM: Longitudinale Muskulatur

L-NNA: N^G-nitro-L-Arginin

L-NAME: N^G-nitro-L-Arginin-Methylester

LPS: Lipopolysaccharid

MP: myenterischer Plexus

mRNA: "messenger"-Ribonukleinsäure

NADPH: Nicotinamid Dinukleotid Phosphat

NO: Stickstoffmonoxid

NOS: Stickstoffmonoxidsynthase

n.s.: nicht signifikant

RMP: Ruhemembranpotential

TTX: Tetrodotoxin

WT: Wildtyp

ZM: Zirkuläre Muskulatur

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Peristaltischer Reflex-Dünndarm

3.1.1 Versuchstiere

Zur Versuchsdurchführung wurden männliche Wistar Ratten von der Firma Charles GmbH River, Sulzfeld/Deutschland bezogen. Diese wurden bei künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus artgerecht unter standardisierten Bedingungen gehalten. Am Vorabend des Versuchstages wurden die Ratten bis zum Versuch bei freiem Zugang zu Wasser nüchtern gesetzt. Das durchschnittliche Gewicht betrug 300-350g bei einer Kopf-Steißlänge von 37-43cm.

3.1.2 Versuchsanordnung

Ein doppelwandiges Organbad wurde mit KRP (KRP: NaCl 115.5 mM, MgSO₄ 1.16 mM, NaH₂PO₄ 1.16 mM, Glucose 11.1 mM, NaHCO₃ 21.9 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KCl 4.16 mM) gefüllt, das durch Umspülung bei einer konstanten Temperatur von 37°C gehalten wurde. Durch eine Trennwand, die nach oben geöffnet ist, wird das Organbad in zwei Kammern geteilt. In die obere Öffnung der Trennwand wurde das Dünndarmstück von ca. 10 cm Länge, nach Überstülpen auf eine Drahtstab, gelegt. Die Öffnung über dem Darm wurde durch einen Schieber geschlossen, sodass zwei getrennte Kammern entstanden. Zur weiteren Abdichtung wurde dabei im Bereich der Trennwand hochvisköse inerte Silikonpaste um den Darm eingebracht, sodass die Kammern zum einen dicht voneinander getrennt sind, jedoch eine gewisse Mobilität des sich kontrahierenden Darmstückes gewährleistet ist. Zur Ableitung der Muskelkontraktionen wurden Klammern der Kraftwandler an den Darm in die Ableitungskammer gebracht. Die isometrischen Kontraktionen wurden durch den Kraftwandler in elektrische Signale umgewandelt und nach Verstärkung durch einen Schreiber aufgezeichnet. Bei den Kraftwandlern wurde eine Vorspannung von 50 mN gewählt. In die Stimulationskammer wurde eine Elektrode aus Platin eingeführt, über die eine elektrische Feldstimulation (drei Impulse pro Sekunde, eine Millisekunde Dauer und 40 Volt) ausgelöst wurde. (Abb. 1)

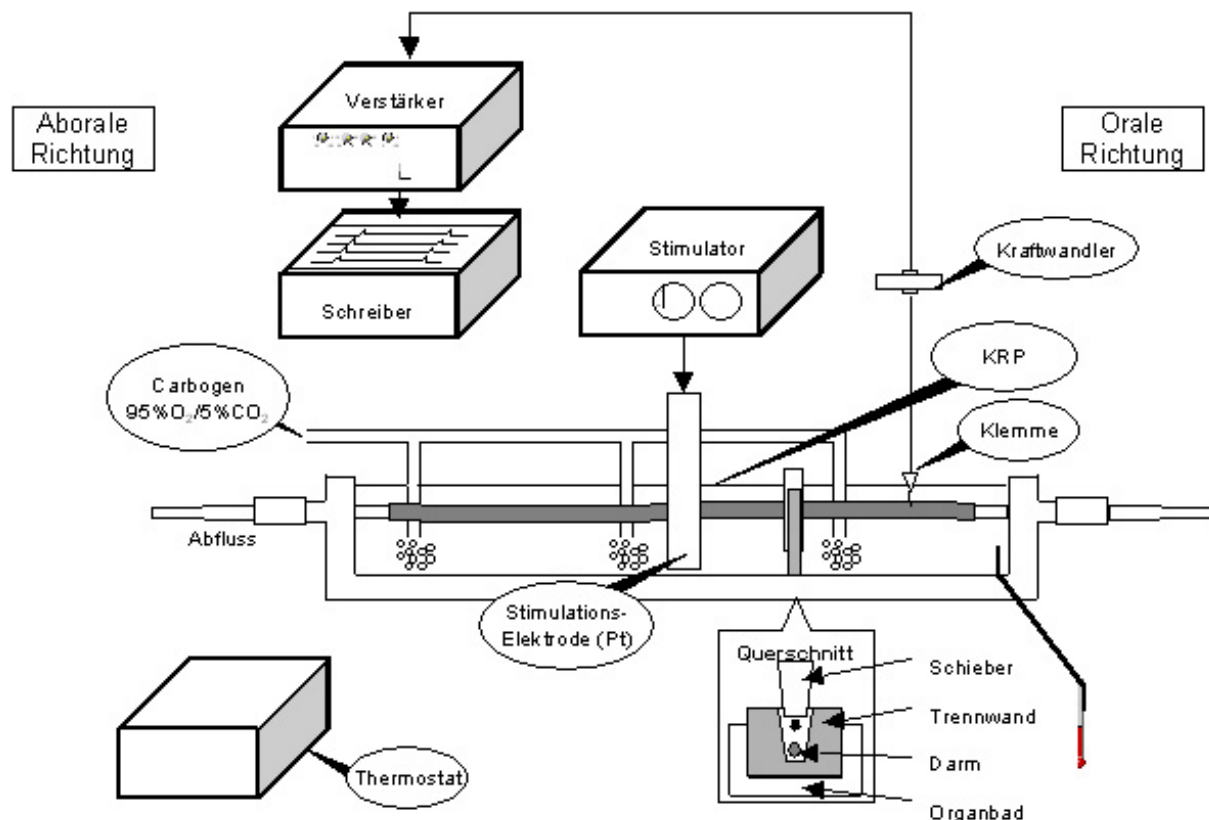


Abbildung 1: Etwa 10 cm lange Dünndarmsegmente der Ratte wurden in das doppelwandige Organbad eingespannt und an beiden Enden mittels Fäden fixiert. Nach der Stimulation über die Platinelektrode (40V, 3Hz, 1ms) konnten über den Kraftwandler die ascendierenden Kontraktionen des peristaltischen Reflexes abgeleitet werden

3.1.3 Versuchsdurchführung

Nach kurzfristiger Begasung der Ratten mit CO₂ wurden diese durch intraperitoneale Injektion von Natrium-Pentobarbital (Narcoren®) betäubt. Nach eingetretener Bewusstlosigkeit wurde durch einen Medianschnitt das Peritoneum eröffnet. Nach dem Aufsuchen des Pylorus wurde durch Inzision des Duodenums ein Katheter eingeführt, durch welchen der Dünndarm *in-situ* mit KRP gereinigt wurde. Der Darminhalt wurde dann durch Durchtrennung des Ileums kurz vor dem Zökum abgeleitet. Nach gründlicher Reinigung des Dünndarms wurde dieser entnommen und in KRP eingelegt, die ständig mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% CO₂) begast wurde.

Nach vorsichtiger Präparation und Abtrennung des Darmgekröses wurde ein etwa 10 cm langes Darmstück, nach Überstülpen auf einen Drahtstab in weiter oben beschriebenes Organbad eingespannt. Nach einer 20 min Äquilibrationsphase wurde das Darmstück elektrisch stimuliert. Dabei zeigte sich oral eine Kontraktion.

Nach einer weiteren 20 min Äquilibrationsphase und dem Auftreten von mindestens drei gleichen Reaktionen wurde der Versuch durch Zugabe von Anandamid und dessen Antagonisten AM251 in kumulativ ansteigender Konzentration (10^{-9} - 10^{-5} M) entweder in die orale Ableitungskammer oder Stimulationskammer begonnen. Im einzelnen wurden dabei folgende Versuche durchgeführt:

- Wirkung von Anandamid auf die ascendierende, elektrisch induzierte Kontraktion bei Applikation in die Stimulationskammer
- Wirkung von AM251 auf die ascendierende, elektrisch induzierte Kontraktion bei Applikation in die Stimulationskammer
- Wirkung von Anandamid auf die ascendierende, elektrisch induzierte Kontraktion bei Applikation in die Ableitungskammer
- Wirkung von AM251 auf die ascendierende, elektrisch induzierte Kontraktion bei Applikation in die Ableitungskammer
- Wirkung von Anandamid auf die Latenz der ascendierenden Kontraktion bei Applikation in die Stimulations- und in die Ableitungskammer
- Wirkung von AM251 auf die Latenz der ascendierenden Kontraktion bei Applikation Stimulations- und in die Ableitungskammer

Anandamid wurde in isotonischer Kochsalzlösung gelöst. Die weitere Verdünnung erfolgte in isotonischer Kochsalzlösung. Die Auflösung von AM251 erfolgte zunächst in einem Tropfen Tween 80, anschließend in ein ml DMSO 95% und 1 ml isotonischer Kochsalzlösung. Die weitere Verdünnung wurde in isotonischer Kochsalzlösung durchgeführt. Die entsprechende Kontrolle mit den verwendeten Lösungsmitteln erbrachte keine Veränderungen der untersuchten Parameter.

Nach dem Versuch wurde die Dichtigkeit der Kammern durch Zugabe von Methyleneblau zum einen, als auch konsekutiver Entleerung der Kammern und der Beobachtung einer möglichen Undichtigkeit im Bereich der Trennwand gewährleistet.

Versuche, die ein Leck im Bereich der Trennwand aufwiesen, wurden nicht ausgewertet.

3.1.4 Datenauswertung

Wie bereits erwähnt, wurde durch die elektrische Feldstimulation eine oralwärts gerichtete Kontraktion ausgelöst. In die Datenauswertung gingen dabei die Höhe und Fläche der Kontraktionen als Messgrößen ein. Die Höhe wurde als größter Abstand zwischen Basallinie und dem jeweiligen Ausschlag der Reflexantwort abgelesen. Die Fläche wurde mittels eines Digitalisierungsbrettes (Software: Sigma Scan, Jandel Scientific) als Integral über der Zeit berechnet. Zur Berechnung wurden jeweils der Mittelwert aus drei aufeinanderfolgenden Kontraktionen ermittelt. Als Ausgangswert diente dabei der Mittelwert der ersten drei gleichmäßigen Kontraktionen nach der Äquilibrationsphase. Der Wirkung der Substanzen wurde im Verhältnis zum Ausgangswert als Prozent berechnet.

Ferner wurde die Latenz zwischen dem Beginn der elektrischer Feldstimulation und dem Auftreten der oralen Kontraktion abgelesen. Als Referenzwert diente dabei der entsprechende Mittelwert der ersten drei repräsentativen Reflexantworten. (Abb. 2)

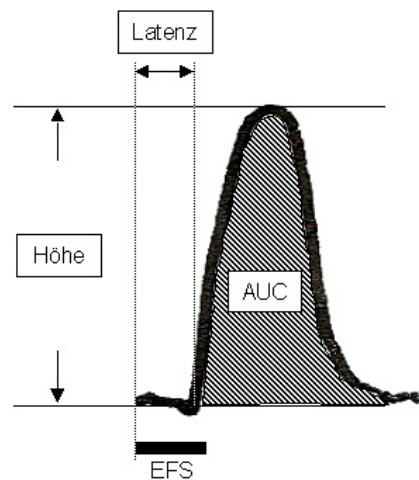


Abbildung 2: Schematische Darstellung der in die Auswertung eingehenden Größen: Höhe, Fläche (AUC=Area under the curve) und Latenz (EFS=elektrische Feldstimulation)

3.1.5 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (Standard error of the mean S.E.M.) angegeben. n steht für die Anzahl unabhängiger Experimente an unterschiedlichen Organsegmenten. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der

Student-t-Test für gepaarte Stichproben angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3.2 Elektrophysiologische, intrazelluläre Ableitung

3.2.1 Versuchstiere

Die Dünndarm-Präparation der Wildtypmäuse als Referenzgruppe wurde aus männlichen C57BL/6 Mäusen ebenfalls der Firma Charles River GmbH, Sulzbach/Deutschland mit einem Körpergewicht von 25 g bis 35 g entnommen. Diese wurden bei künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus artgerecht unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Tiere wurden, unter CO₂- Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Bei allen Versuchen wurde der für die Experimente notwendige Dünndarm sofort entnommen, und für die Präparation in KRP überführt.

Die CB₁-Rezeptor-Knockout-Mäuse als Versuchsgruppe entstammen einer Züchtung des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, München (PD Dr. B. Lutz) und wurden der Arbeitsgruppe im Rahmen einer Kooperation freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Versuchsdurchführung

Der komplette Dünndarm wurde durch einen medianen Bauchschnitt entnommen und in ein Präparationsbad überführt. Alle Präparationsschritte wurden in mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) oxygeniertem KRP (NaCl 115.5 mM, MgSO₄ 1.16 mM, NaH₂PO₄ 1.16 mM, Glucose 11.1 mM, NaHCO₃ 21.9 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KCl 4.16 mM) durchgeführt. Vom ganzen Dünndarm wurde das mesenteriale Fettgewebe abpräpariert und der Darm entlang des mesenterialen Randes scharf geöffnet und vom Darminhalt durch wiederholte Spülung gereinigt. Das Gewebe wurde dann unter einem Mikroskop weiterpräpariert, die Mukosa und Submukosa mit Präzisionspinzetten von der Tunica muscularis abgetrennt. Anschließend wurde ein etwa 3 mm langes Segment der Tunica muscularis mit dem enthaltenen myenterischen Plexus parallel zur zirkulären Muskelschicht abgeschnitten und für elektrophysiologische Untersuchungen verwendet.

3.2.3 Versuchsaufbau der intrazellulären Ableitung

Kleinste Gewebeschnitte des Dünndarms wurden zur Minimierung der bei 37°C beträchtlichen Spontanbewegung des Gewebes mit feinen Wolfram Nadeln (15, 25 µm Diameter) an dem mit Sylgard ausgegossenen Boden der elektrophysiologischen Messkammer so fixiert, dass die zirkuläre Muskelschicht nach oben zum Liegen kam. Die Messkammer wurde konstant (5 ml/min⁻¹; Kwik Pumpe, World Precision

Instruments) mit auf 37 °C vorgewärmtem und oxygeniertem KRP perfundiert. Nur nach Gewebefixierung war eine intrazelluläre Ableitung von stabilen Membranpotentialen möglich, da sonst Bewegungsartefakte zu Impedanzänderung der Glaskapillare und des Kapillar-Zellkontaktes bis hin zu Kontaktverlusten führen. In speziellen Versuchsgängen wurde zur weiteren Herabsetzung der Spontanbewegung der L-Typ Calciumkanal- Antagonist Nifedipin zugesetzt (56). Dieser hemmt über die muskulären L-Typ Calciumkanäle die elektromechanische Kopplung, ohne die elektrischen Eigenschaften der neuromuskulären Transmission wesentlich zu verändern (176). Während das Gewebe nach Ausspannen und Fixieren äquilibrierte, wurden über Mikromanipulatoren feingesteuert Paare von Mikro-Stimulationselektroden aus Platin (2.5 mm² Stimulationsoberfläche), die über eine Stimulus-Isolationseinheit (Isolation unit, Grass SIU59, Massachusetts, USA) mit einem Grass S11 Stimulator verbunden waren, senkrecht zur zirkulären Muskelschicht am Gewebe angebracht. Damit konnten die Neurone bestimmter Gewebeabschnitte durch ein elektrisches Feld (einzelne Stimuli, 10 Pulse bei 1 oder 5 Hz, 0.3 ms Dauer, 15 V Stärke) stimuliert werden. Der gesamte Versuchsaufbau, wie das Einbringen der Platinelektroden und nach der Äquilibrationsphase (90 bis 120 Minuten) das Einstechen der Glaskapillare, fanden in einem Faradayschen Käfig statt (s.Abb. 3).

Kapillarglasmikroelektroden (Borosilikat Glas Kapillare, 1.0 mm OD x 0.58 mm ID Clark Electromedical Instruments) wurden mit einem Mikroelektrodenpuller (Model P-97, 3 mm Heizfaden; (Sutter Instrument Co, USA) gezogen und mit KCL (3 M) angefüllt und hatten so eine Resistenz im Bereich von 100-150 MΩ. Die elektrische Aktivität wurde gegen eine in der Messkammer platzierte Ag-AgCl "Erdungs" Elektrode registriert und danach mit einem DUO 733 Mikroelektroden-Verstärker verstärkt (National Instruments, USA).

Das analoge Ausgangssignal vom Verstärker wurde mit Analog-Digital Wandler und einer Datenakquisitionskarte (SCB 68 interface, National Instruments, USA) in digitale Signale umgewandelt und digital auf einem PC mittels der Software LABVIEW, Version 5.0. aufgezeichnet. Die Amplituden (mV) der elektrischen Ereignisse wurden im Vergleich zum RMP vor der Applikation der elektrischen Stimuli gemessen.

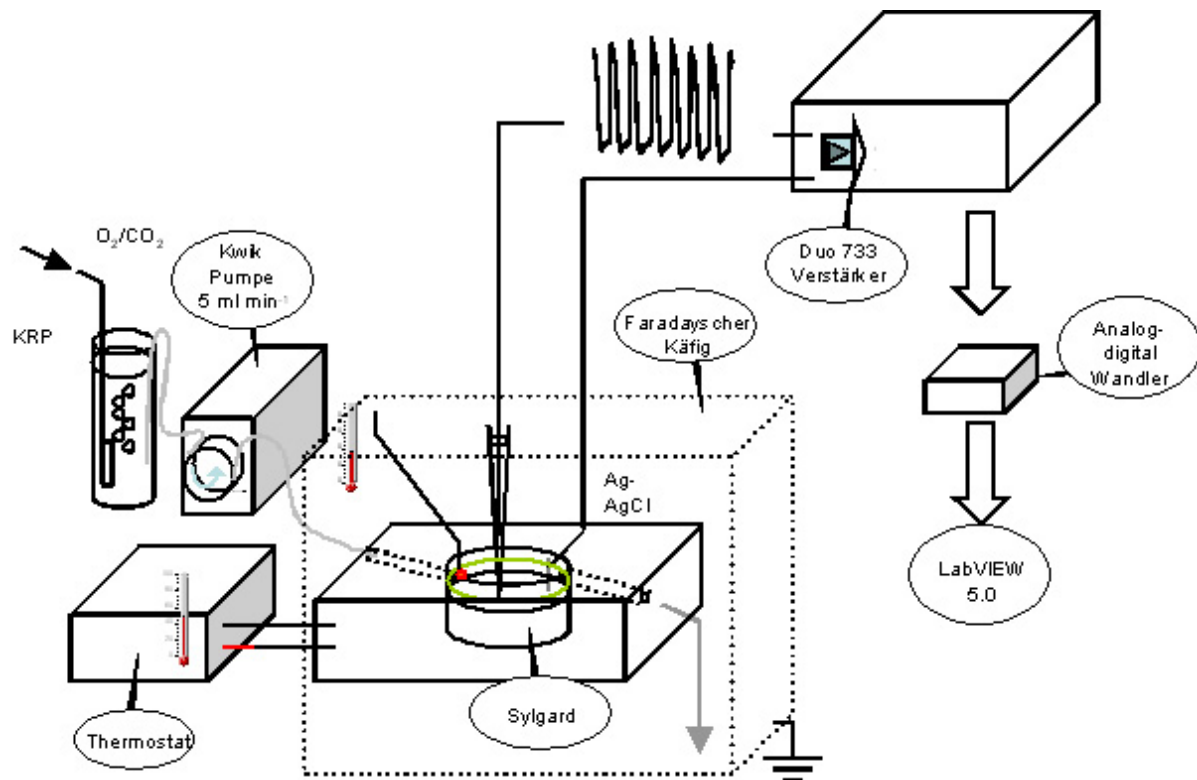


Abbildung 3: Die Streifen der zirkulären muskulären Schicht mit erhaltenem Plexus myentericus wurden mit dünnen Wolfram Drähten (15, 25 μm Diameter) auf dem mit Sylgard ausgegossenen Boden der electrophysiologischen Kammer so fixiert, dass die ZM oben zum Liegen kommt. Die Kammer wurde mit vorgewärmten und Carbogen-begastem KRP (pH7,4, $T=37^\circ\text{C}$) perfundiert. Kapillarglasmikroelektroden wurden gezogen, mit KCL (3 M) angefüllt (Resistenz 100-150 M Ω). Die zelluläre Antwort wurde durch eine im Organbad platzierte Ag-AgCl "Erdungs" Elektrode registriert und danach mit einem Verstärker verstärkt. Das analoge Ausgangssignal des Verstärkers wurde in eine digitale Form umgewandelt und auf dem PC mittels der Software LABVIEW Version 5.0 gespeichert.

3.2.4 Datenauswertung

Für die Auswertung der elektrischen Aktivität des Dünndarms wurden Amplitude und Frequenz als Parameter ausgewählt. Nach dem Setzen eines stabilen Kontaktes der angestochenen Zelle mit der Mikroelektrode und einer Äquilibrationszeit von 60 min wurden Potentiale abgeleitet und aufgezeichnet. Für die Auswertung der electrophysiologischen Experimente am Dünndarm der Maus wurde die Veränderung des RMP nach elektrischer Feldstimulation gemessen und die maximale Amplitude des IJPs ermittelt (205).

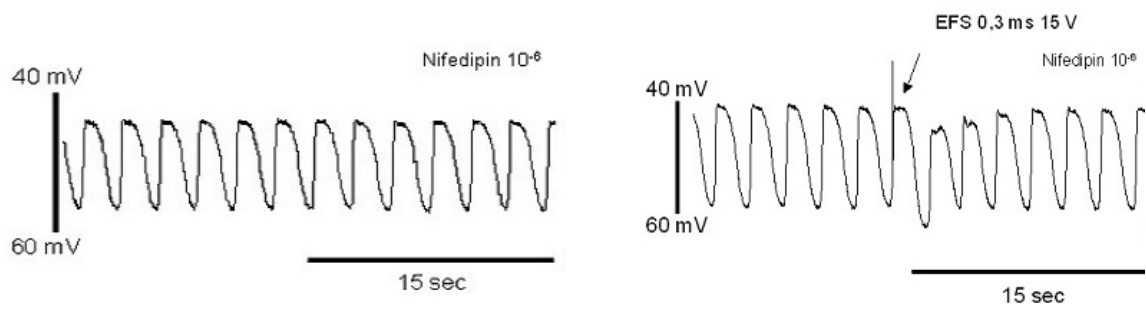


Abbildung 4: Bei der Datenauswertung wurde die Amplitude und Frequenz der slow waves als auch der IJPs abgelesen

3.3 Transitversuche

3.3.1 Versuchstiere

Für diesen Versuchsteil fanden dieselben Tiere Anwendung wie bereits unter 3.2.1 beschrieben.

3.3.2 Versuchsvorbereitung

Die Mäuse erhielten 0,3 ml eines nicht resorbierbaren Markers (10% Carbo medicinalis, 5% gum arabic) per os; mittels einer Fütterungssonde 20 min nach der Instillation wurden die Mäuse nach CO₂-Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Sofort danach wurde das Abdomen durch einen Medianschnitt eröffnet und der Dünndarm der Tiere entnommen.

3.3.3 Statistische Auswertung

Die nach dem Pylorus zurückgelegte Strecke in Millimeter der Markersubstanz wurde in Verhältnis zur Gesamtlänge des Dünndarms vom Pylorus bis zum Zökum gesetzt und in Prozent angegeben. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angeführt. n steht für die Anzahl unabhängiger Experimente an unterschiedlichen Tieren. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der Student-t-Test für ungepaarte Stichproben angewendet. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

3.4 Verwendete Substanzen

- Anandamid (Biotrend, Köln, Deutschland)
- AM251 (Biotrend, Köln, Deutschland)
- Narcoren (Merial, Hallbergmoos, Deutschland)
- Nifedipin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- DMSO (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Carbo medicinalis (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Gum arabicum (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

3.5 Verwendete Geräte

- Digitalisierungsbrett Pearl Electronics Pad XXL zur Flächenberechnung mit Sigma Scan als Auswertungsprogramm (Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland)
- Kraftwandler: FTO3C Force Transducer (Grass, Quincy, Massachusetts, USA)
- Mundgeblasenes Organbad doppelwandig aus Glas (Laborglaswaren Josef Schmitz, München, Deutschland)
- Platinelektroden in Glas (Laborglaswaren Josef Schmitz, München, Deutschland)
- Schreiber: Sormedics R611 (Ananheim, Californien, USA)
- Stimulator: Grass S11 Stimulator (Grass, Quincy, Massachusetts, USA)
- Perfusion Pumpe: Kwik Pumpe (World Precision Instruments, USA)
- Mikroelektroden Puller Model P-97 (Sutter Instruments, USA)
- Stimulus Isolation Unit Grass SIU59 (Grass, Quincy, Mass., USA)
- Mikromanipulatoren: Narashigae (World Precision Instruments)
- Borosilikat Glas Kapillaren, 1.0 mm OD x 0.58 mm ID (Clark Electromedical Instruments, USA)
- Mikroelektrode Verstärker DUO 733 (National Instruments USA),
- Analog-to-digital Wandler, SCB 68 Interface (National Instruments USA)
- Registrierungsprogramm LABVIEW 5.0 (National Instruments USA)
- Mikroskop Olympus SZ-600 (Olympus, Hamburg, Deutschland)
- Mikroskop Axioplan (Karl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Kaltlichtquelle Olympus (Olympus, Hamburg, Deutschland)

4 ERGEBNISSE

4.1 Peristaltischer Reflex

4.1.1 Wirkung von Anandamid auf die Kontraktionskraft der ascendierenden exzitatorischen Kontraktion bei Applikation in die Stimulationskammer

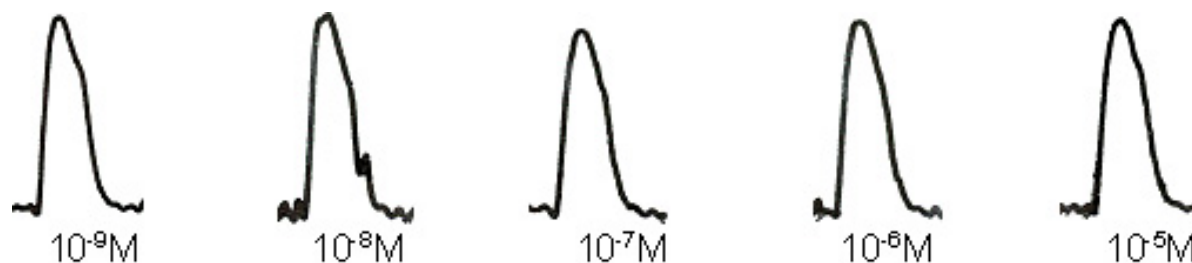


Abbildung 5: Dargestellt sind repräsentative Aufzeichnungen der ascendierenden Reflexantworten unter dem Einfluss von kumulativ steigenden Konzentrationen von Anandamid

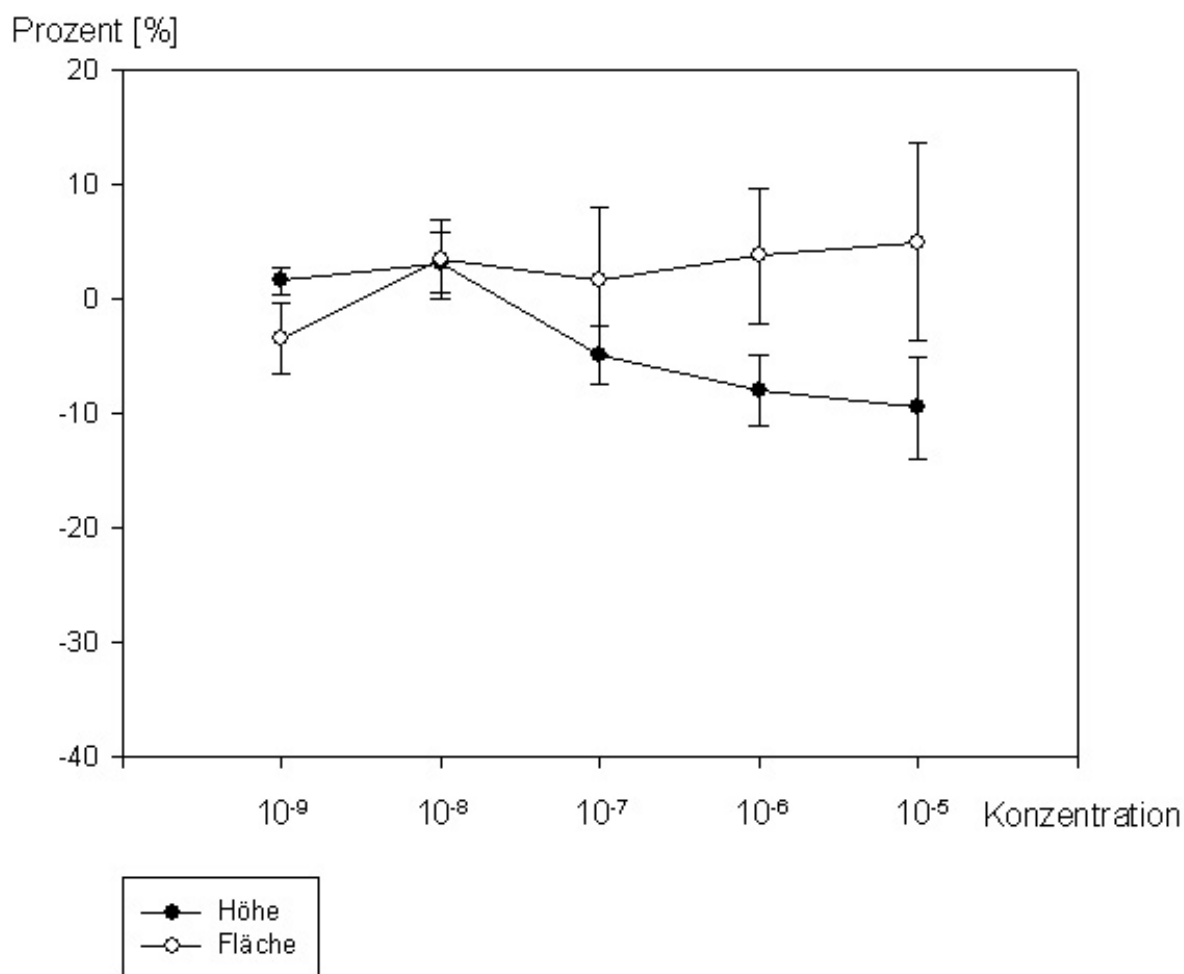


Abbildung 6: Darstellung des Einflusses von Anandamid in kumulativ steigenden Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-5} M) auf den ascendierenden exzitatorischen Reflex bei Applikation in die Stimulationskammer (n=5). Es zeigt sich eine leichte Zunahme der Fläche der Kontraktionen, jedoch ist diese nicht statistisch signifikant

In kumulativ steigenden Konzentrationen hat Anandamid bei Applikation in die Stimulationskammer keinen signifikanten Einfluss auf die Stärke der ascendierenden oralen Kontraktion. Die Trägersubstanz, in dieser Versuchsreihe isotonische Kochsalzlösung, zeigt keinen Einfluss auf die Kontraktion (Ergebnisse nicht aufgeführt). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Anandamid in den gewählten Konzentrationen auf die in den peristaltischen Reflex involvierten Interneurone, die die ascendierende Kontraktion des myenterischen Reflexes vermitteln, keine Wirkung hat.

Tabelle 1: Einfluss von Anandamid auf die Höhe und Fläche der ascendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.)

Konzentration	Höhe	AUC	Signifikanz	
10^{-9} M	$1,6 \pm 1,1$	$-3,4 \pm 3,1$	n.s.	n.s.
10^{-8} M	$3,2 \pm 2,6$	$3,5 \pm 3,5$	n.s.	n.s.
10^{-7} M	$-4,8 \pm 2,5$	$1,6 \pm 6,5$	n.s.	n.s.
10^{-6} M	$-7,9 \pm 3,1$	$3,8 \pm 5,9$	n.s.	n.s.
10^{-5} M	$-9,5 \pm 4,5$	$5,0 \pm 8,7$	n.s.	n.s.

4.1.2 Wirkung von Anandamid auf die Latenz der oralen Kontraktion bei Applikation in die Stimulationskammer

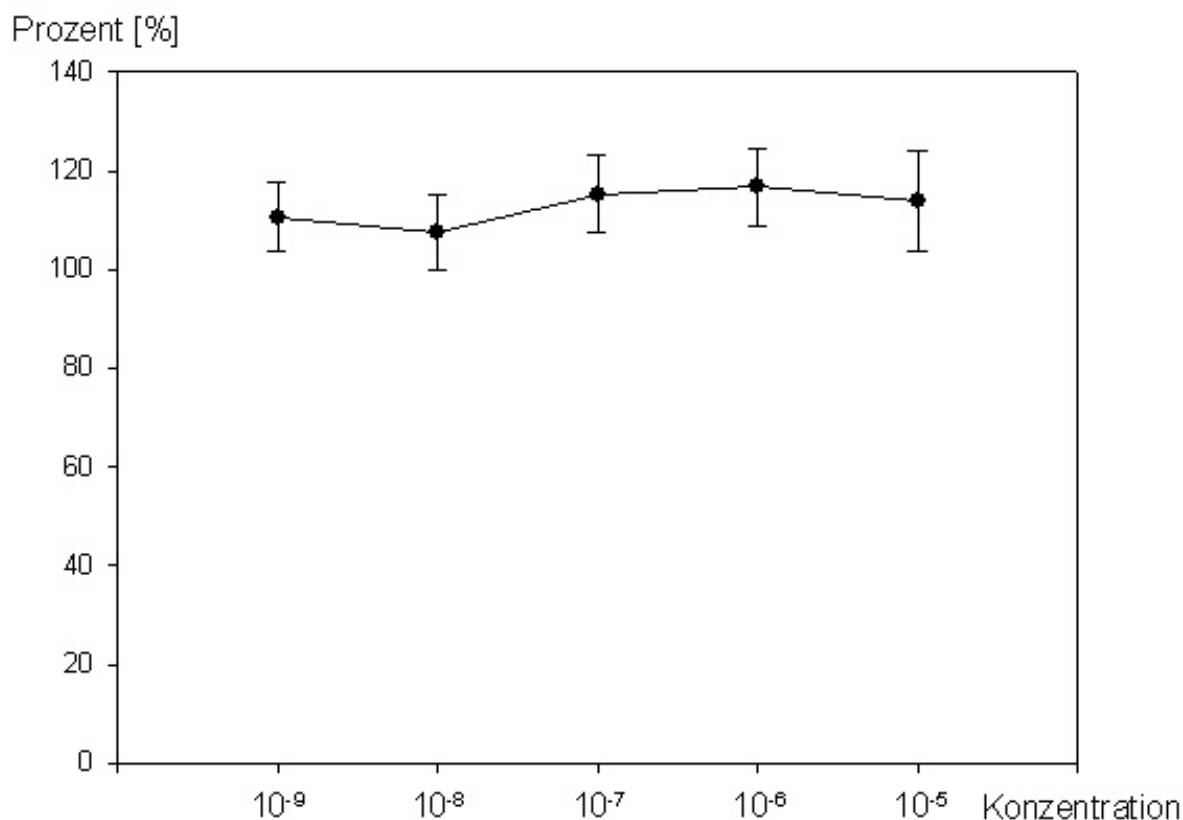


Abbildung 7: Dargestellt ist der Einfluss von Anandamid auf die Latenz der aufsteigenden Kontraktion zwei cm oberhalb des Stimulationsortes. Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss.

Anandamid hat bei Applikation in die Stimulationskammer in kumulativ steigenden Konzentrationen keinen Einfluss auf die Dauer der Latenz im Vergleich zur Trägersubstanz isotonische Kochsalzlösung (Daten nicht aufgeführt). Somit scheint es in den gewählten Konzentrationen keinen Einfluss auf die am peristaltischen Reflex involvierten Interneurone vom Stimulationsort zum Wirkort in der Ableitungskammer zu haben.

Tabelle 2: Einfluss von Anandamid auf die Latenz der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.).

Konzentration	Einfluss Anandamid	Signifikanz
	Latenz	
10^{-9}M	$110,6 \pm 7,0$	n.s.
10^{-8}M	$107,6 \pm 7,5$	n.s.
10^{-7}M	$115,3 \pm 8,0$	n.s.
10^{-6}M	$116,7 \pm 7,8$	n.s.
10^{-5}M	$113,9 \pm 10,3$	n.s.

4.1.3 Wirkung von AM251 auf die Kontraktionskraft der ascendierenden exzitatorischen Kontraktion bei Applikation in die Stimulationskammer

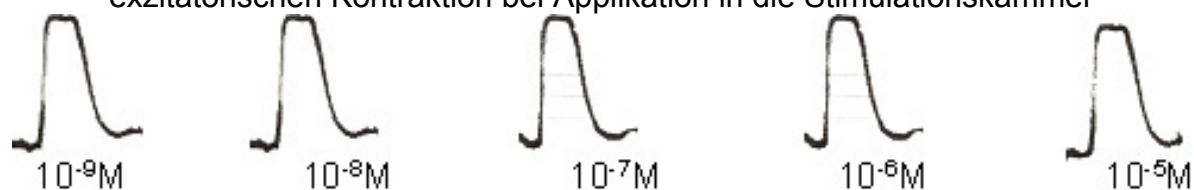


Abbildung 8: Dargestellt sind repräsentative Aufzeichnungen der ascendierenden Reflexantworten unter dem Einfluss von kumulativ steigenden Konzentrationen von AM251

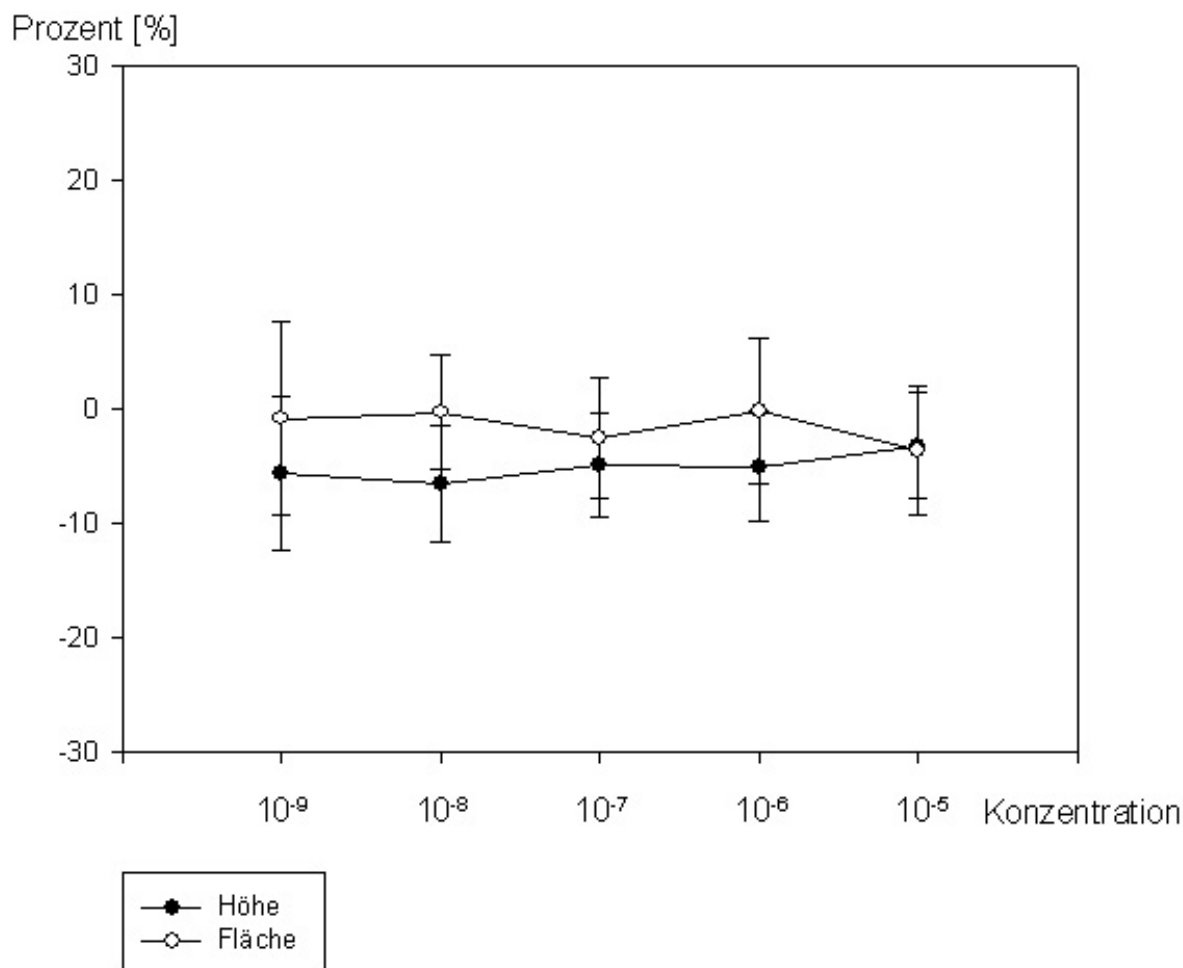


Abbildung 9: Darstellung des Einflusses von AM251 in kumulativ steigenden Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-5} M) auf den ascendierenden exzitatorischen Reflex bei Applikation in die Stimulationskammer (n=4). Es zeigt sich eine leichte Zunahme der Höhe der Kontraktion, jedoch ist diese nicht statistisch signifikant

In kumulativ steigender Konzentration hat AM251 bei Applikation in die Stimulationskammer keinen signifikanten Einfluss auf Stärke der ascendierenden oralen Kontraktion. Die Trägersubstanzen, in dieser Versuchsreihe Tween 80, DMSO und isotonische Kochsalzlösung zeigen keinen Einfluss auf die Kontraktion (Ergebnisse nicht aufgeführt). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass AM251 in den gewählten Konzentrationen auf die in den peristaltischen Reflex involvierten Interneurone, die die ascendierende Kontraktion des myenterischen Reflexes vermitteln, keine Wirkung hat.

Tabelle 3: Einfluss von AM251 auf die Höhe und Fläche der ascendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.).

Konzentration	Höhe	AUC	Signifikanz	
10^{-9}M	$-5,5 \pm 6,7$	$-0,8 \pm 8,4$	n.s.	n.s.
10^{-8}M	$-6,5 \pm 5,1$	$-0,2 \pm 5,0$	n.s.	n.s.
10^{-7}M	$-4,9 \pm 4,6$	$-2,5 \pm 5,3$	n.s.	n.s.
10^{-6}M	$-5,0 \pm 4,8$	$-0,2 \pm 6,4$	n.s.	n.s.
10^{-5}M	$-3,2 \pm 4,6$	$-3,6 \pm 5,6$	n.s.	n.s.

4.1.4 Wirkung von AM251 auf die Latenz der oralen Kontraktion bei Applikation in die Stimulationskammer

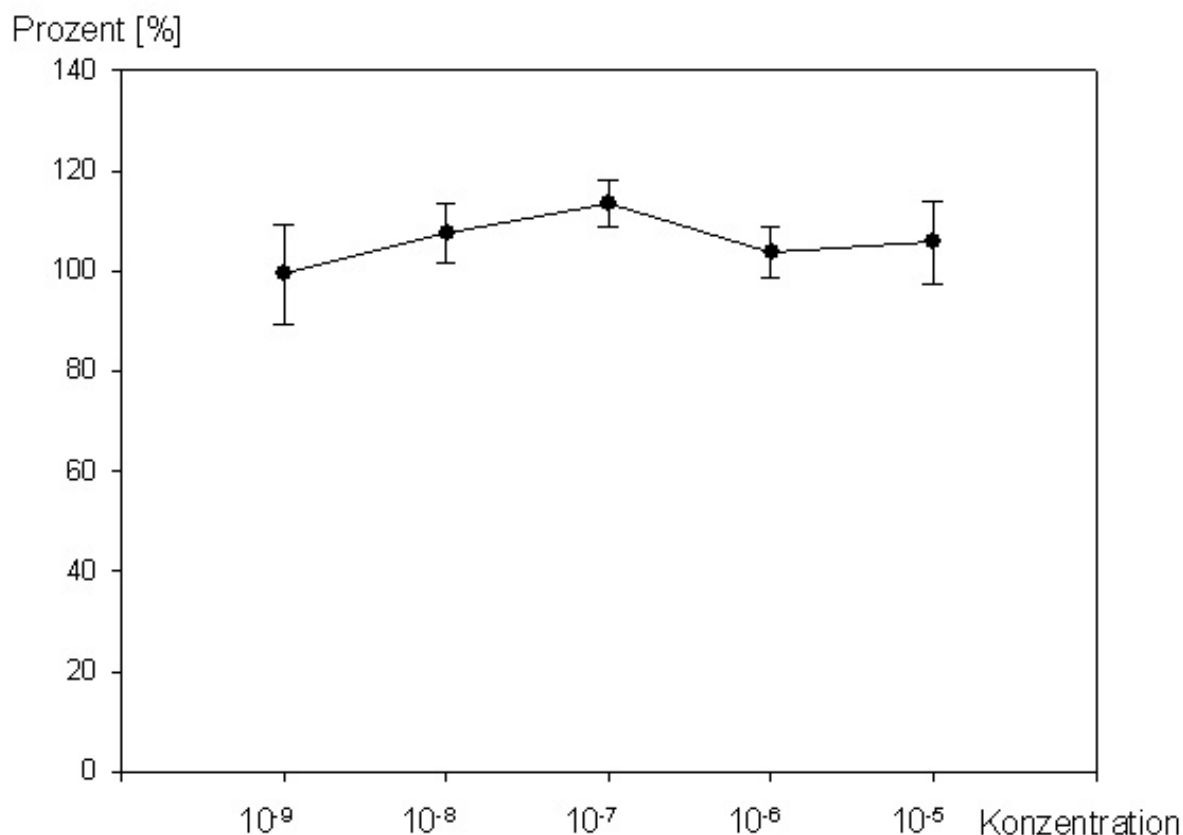


Abbildung 10: Zeigt den Einfluss von AM251 auf die Latenz der aszendierenden Kontraktion zwei cm oberhalb des Stimulationsortes. Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss.

AM251 hat bei Applikation in die Stimulationskammer in kumulativ steigender Konzentration keinen Einfluss auf die Dauer der Latenz im Vergleich zur Trägersubstanz aus Tween 80, DMSO und isotonischer Kochsalzlösung (Daten nicht aufgeführt). Somit scheint es in den gewählten Konzentrationen keinen Einfluss auf die am peristaltischen Reflex involvierten Interneurone vom Stimulationsort zum Wirkort in der Ableitungskammer zu haben.

Tabelle 4: Einfluss von AM251 auf Latenz der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentration. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.).

Konzentration	Einfluss Anandamid	Signifikanz
	Latenz	
10^{-9}M	$99,3 \pm 9,8$	n.s.
10^{-8}M	$107,6 \pm 5,8$	n.s.
10^{-7}M	$113,5 \pm 4,5$	n.s.
10^{-6}M	$103,7 \pm 5,0$	n.s.
10^{-5}M	$105,8 \pm 8,2$	n.s.

4.1.5 Wirkung von Anandamid auf die Höhe und Fläche der ascendierenden Kontraktion bei Applikation in die orale Kammer

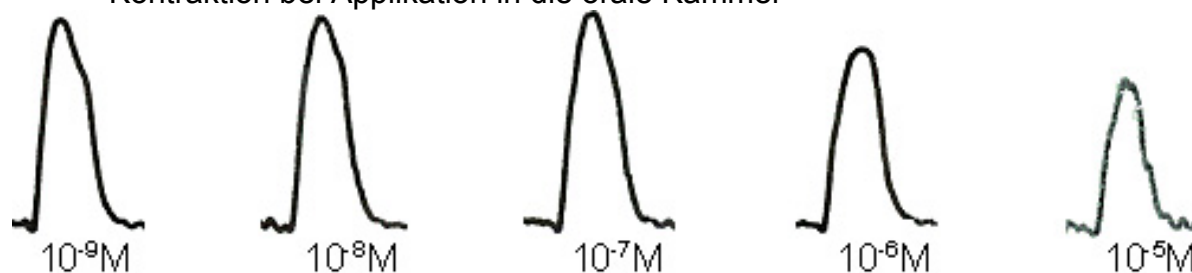


Abbildung 11: Dargestellt sind repräsentative Aufzeichnungen der ascendierenden Reflexantworten unter dem Einfluss von kumulativ steigenden Konzentrationen von Anandamid bei Applikation in die Ableitungskammer

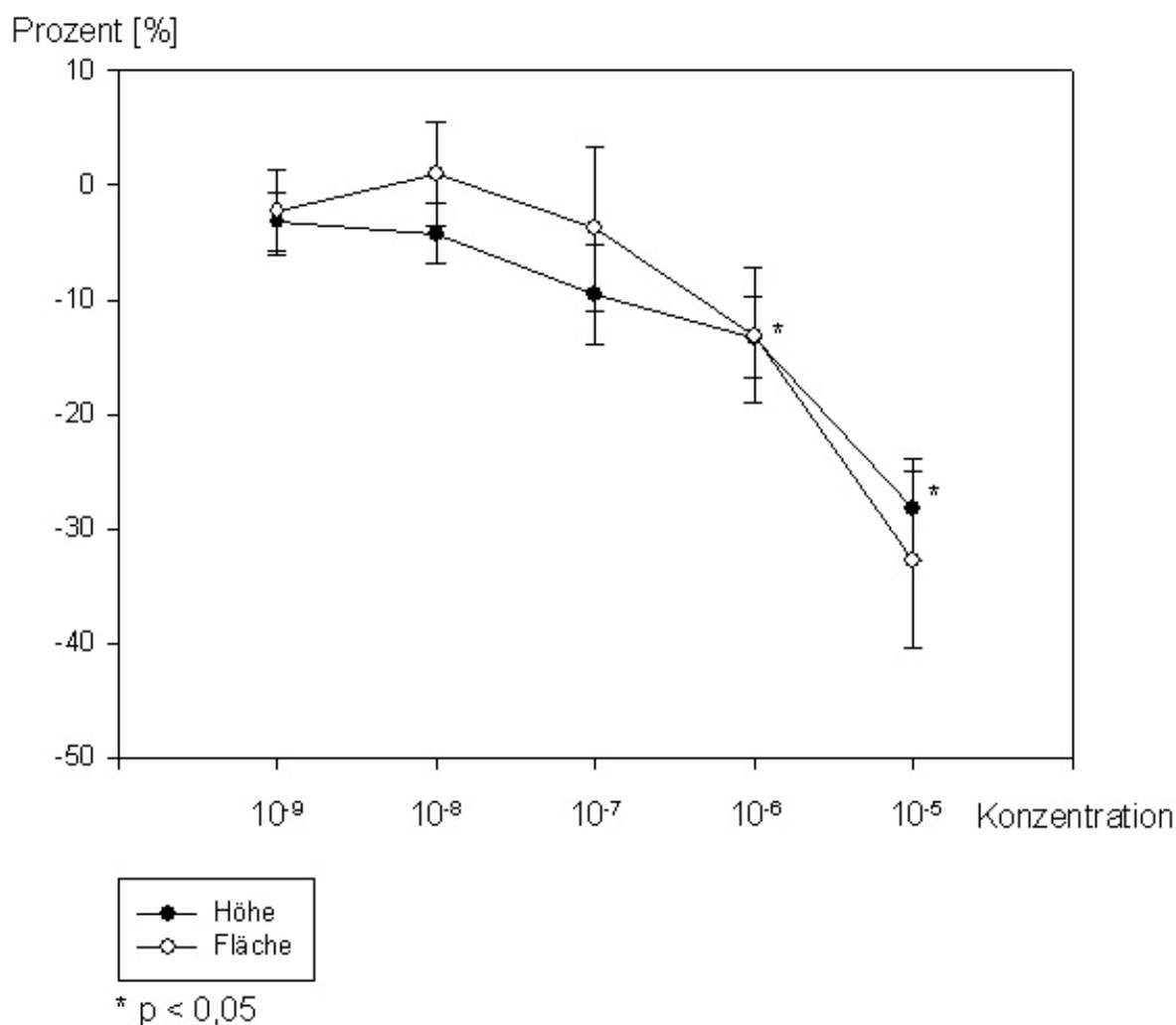


Abbildung 12: Einfluss von Anandamid in kumulativ steigenden Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-5}M) auf den ascendierenden exzitatorischen Reflex bei Applikation in die orale Kammer. Es zeigt sich eine Hemmung der Kontraktionskraft in Höhe und AUC (n=6)

Bei Zugabe in die Ableitungskammer zeigt Anandamid in kumulativ steigenden Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-5} M) eine Hemmung der aufsteigenden exzitatorischen Kontraktion ($n=6$). Dies weist darauf hin, dass im Gegensatz zur Applikation in die Stimulationskammer die Freisetzung von stimulierenden Substanzen, a.e. Acetylcholin, gehemmt wird. Somit scheinen die CB₁-Rezeptoren im Bereich zwischen finalen Motoneuron und glatter Muskelzelle bzw. finalen Motoneuron und ICC gelegen zu sein.

Tabelle 5: Einfluss von Anandamid auf die Höhe und Fläche der aufsteigenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.)

Konzentration	Höhe	AUC	Signifikanz	
10^{-9} M	$-3,2 \pm 2,6$	$-2,3 \pm 3,7$	n.s.	n.s.
10^{-8} M	$-4,2 \pm 2,6$	$1,0 \pm 4,6$	n.s.	n.s.
10^{-7} M	$-9,6 \pm 4,3$	$-3,8 \pm 7,1$	n.s.	n.s.
10^{-6} M	$-13,3 \pm 3,5$	$-13,1 \pm 5,8$	< 0,01	< 0,01
10^{-5} M	$-28,3 \pm 4,5$	$-32,7 \pm 7,8$	< 0,01	< 0,01

4.1.6 Wirkung von Anandamid auf die Latenz der aszendierenden Kontraktion bei Applikation in die orale Kammer

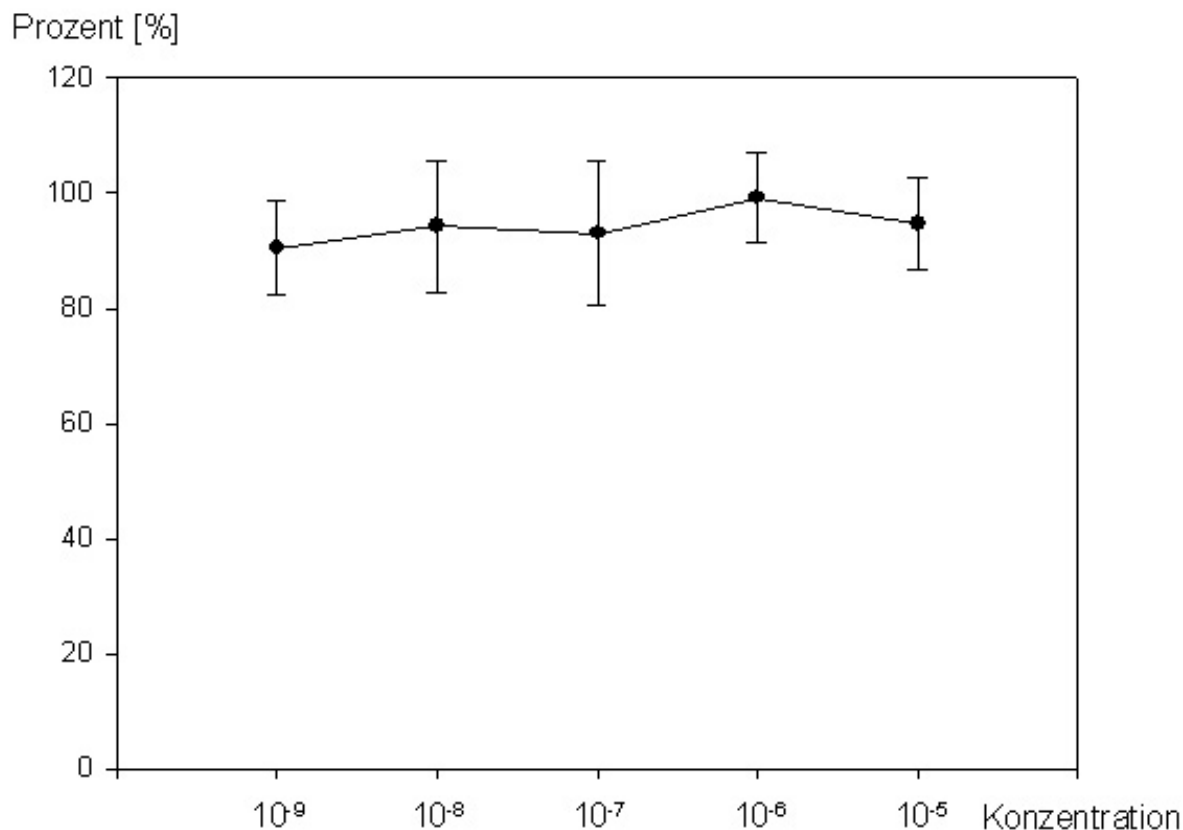


Abbildung 13: Darstellung der Wirkung von Anandamid auf die Latenz der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-5} M) bei Applikation in die Ableitungskammer (n=6) im Abstand von 2cm von der Stimulationselektrode

Anandamid hat bei Applikation in die Ableitungskammer in kumulativ steigender Konzentration keinen Einfluss auf die Dauer der Latenz im Vergleich zur Trägersubstanz isotonische Kochsalzlösung (Daten nicht aufgeführt). Somit scheint es in den gewählten Konzentrationen keinen Einfluss auf Neurotransmission zu haben.

Tabelle 6: Einfluss von Anandamid auf Latenz der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.)

Konzentration	Einfluss Anandamid	Signifikanz
	Latenz	
10^{-9}M	$90,6 \pm 8,2$	n.s.
10^{-8}M	$94,3 \pm 11,5$	n.s.
10^{-7}M	$93,1 \pm 12,4$	n.s.
10^{-6}M	$99,2 \pm 7,9$	n.s.
10^{-5}M	$94,7 \pm 8,0$	n.s.

4.1.7 Einfluss von AM251 auf die ascendierende Kontraktion bei Applikation in die Ableitungskammer

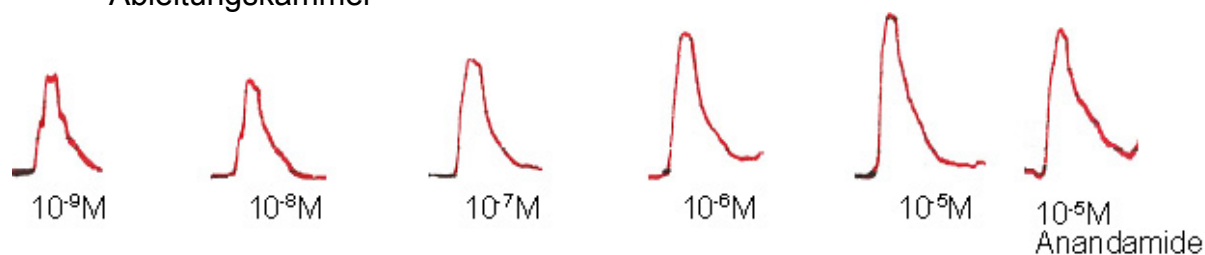


Abbildung 14: Dargestellt sind repräsentative Aufzeichnungen der ascendierenden Reflexantworten unter dem Einfluss von kumulativ steigenden Konzentrationen von AM251 bei Applikation in die Ableitungskammer

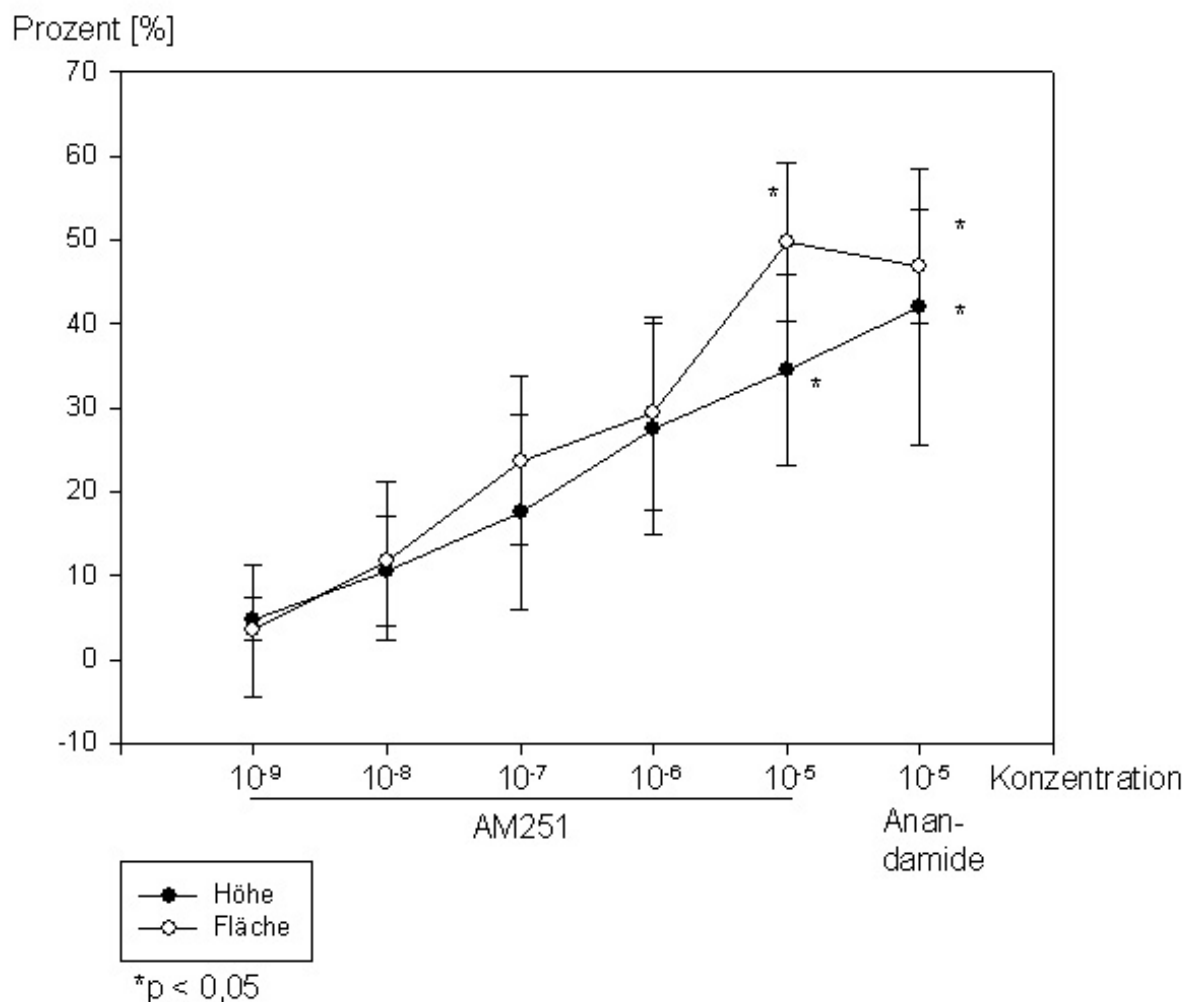


Abbildung 15: Einfluss von AM251 in kumulativ steigenden Konzentrationen (10⁻⁹-10⁻⁵) auf die Höhe und AUC der ascendierenden Kontraktion bei Applikation in die orale Kammer. Es zeigt sich eine starke Zunahme, die nicht durch Anandamid reversibel ist (n=6).

Bei Applikation von AM251 in kumulativ steigender Konzentration (10^{-9} - 10^{-5} M) in die Ableitungskammer zeigt sich eine deutliche Steigerung der aszendierenden Kontraktion (n=6). Die Wirkung von Anandamid wurde nach einer Einwirkungszeit von 20 Minuten abgelesen. Der Effekt weist auf eine stimulierende Wirkung von AM251 auf die Darmmotilität hin. Dies könnte zum einen durch eine invers-agonistische Wirkung von AM251 erklärbar sein, zum anderen aber auch durch die Hemmung eines tonisch aktiven Endocannabinoidsystems im Ileum, wo es durch die regelmäßige Ausschüttung von Endocannabinoiden zur Hemmung der Darmaktivität kommt.

Tabelle 7 : Einfluss von AM251 auf die Höhe und Fläche der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.)

Konzentration	Höhe	AUC	Signifikanz	
10^{-9} M AM251	$4,8 \pm 2,5$	$3,5 \pm 7,9$	n.s.	n.s.
10^{-8} M AM251	$10,5 \pm 6,5$	$11,8 \pm 9,5$	n.s.	n.s.
10^{-7} M AM251	$17,5 \pm 11,6$	$23,7 \pm 10,0$	n.s.	n.s.
10^{-6} M AM251	$27,5 \pm 12,6$	$29,4 \pm 11,5$	n.s.	n.s.
10^{-5} M AM251	$34,5 \pm 11,4$	$49,9 \pm 9,4$	< 0,05	< 0,01
10^{-5} M Anand.	$42,1 \pm 16,5$	$47,0 \pm 6,8$	< 0,05	< 0,01

4.1.8 Einfluss von AM251 auf die Latenz der aszendierenden Kontraktion bei Applikation in die Ableitungskammer

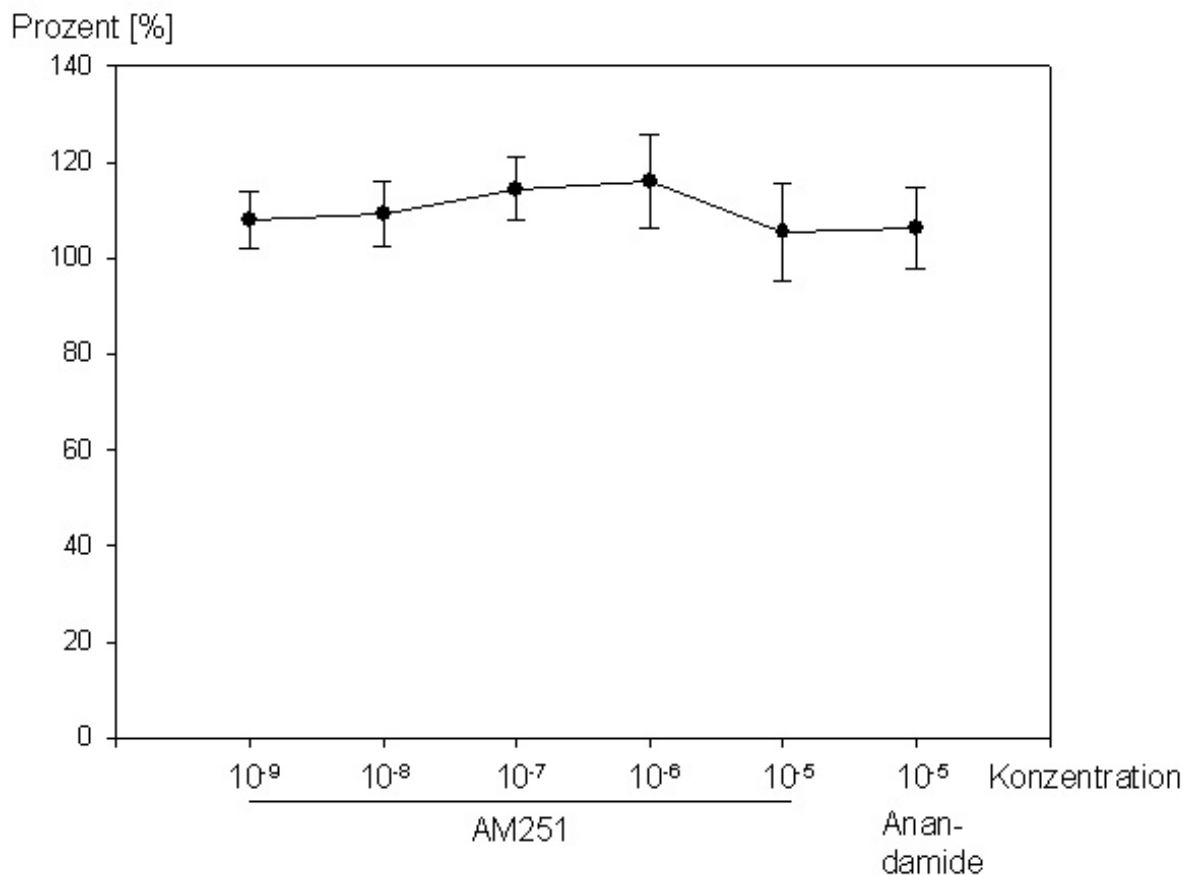


Abbildung 16: Darstellung der Wirkung von AM251 auf die Latenz der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-5} M) bei Applikation in die Ableitungskammer (n=6) im Abstand von 2 cm von der Stimulationselektrode

AM251 hat bei Applikation in die Stimulationskammer in kumulativ steigender Konzentration keinen Einfluss auf die Dauer der Latenz im Vergleich zur Trägersubstanz isotonische Kochsalzlösung, DMSO und Tween 80 (Daten nicht aufgeführt). Somit scheint es in den gewählten Konzentrationen keinen Einfluss auf die am peristaltischen Reflex involvierten Interneurone vom Stimulationsort zum Wirkort in der Ableitungskammer zu haben.

Tabelle 8: Einfluss von AM251 auf Latenz der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigender Konzentration. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.)

Konzentration	Einfluss Anandamid	Signifikanz
	Latenz	
10^{-9} M AM251	$108,0 \pm 5,7$	n.s.
10^{-8} M AM251	$109,4 \pm 6,8$	n.s.
10^{-7} M AM251	$114,4 \pm 6,5$	n.s.
10^{-6} M AM251	$116,0 \pm 9,6$	n.s.
10^{-5} M AM251	$105,3 \pm 10,1$	n.s.
10^{-5} M Anandamid	$106,2 \pm 8,5$	n.s.

4.2 Intrazelluläre Ableitung der Membranpotentiale der zirkulären Dünndarmmuskulatur an Wildtypmaus und CB₁ -/- Mäusen

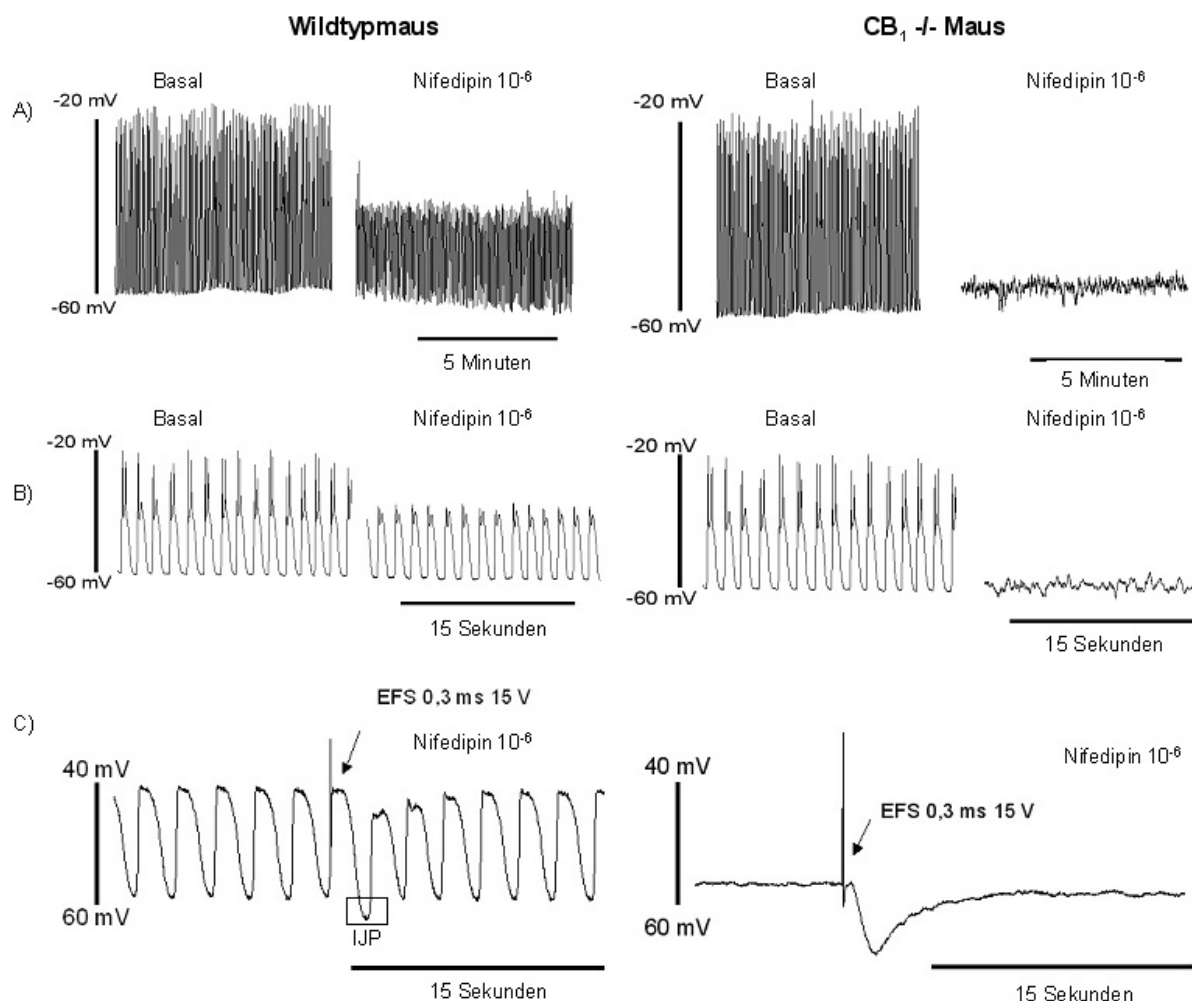


Abbildung 17: A) Darstellung der spontanen Basalaktivität der glatten zirkulären Dünndarmmuskelzelle im Ruhezustand und unter dem Einfluss von 10⁻⁶M Nifedipin zwischen Wildtypmaus links und CB₁-/- Maus rechts. B) Darstellung der spontanen Basalaktivität der glatten zirkulären Dünndarmmuskelzelle im Ruhezustand und unter dem Einfluss von 10⁻⁶M Nifedipin zwischen Wildtypmaus links und CB₁-/- Maus rechts in einem kleineren Maßstab C) Darstellung der Auslösung von IJPs zwischen der glatten zirkulären Dünndarmmuskelzelle im Ruhezustand und unter dem Einfluss von 10⁻⁶M Nifedipin zwischen Wildtypmaus links und CB₁-/- Maus rechts.

Aufgrund der beschränkten Anzahl von CB₁-/- Mäusen konnte in dieser Versuchsreihe nur orientierende Versuche durchgeführt werden. Dabei zeigte sich unter dem Einfluss von 10⁻⁶M Nifedipin bei CB₁-/- Mäusen im Vergleich zur Wildtypmaus, daß keine slow waves nachzuweisen sind. Die Basalaktivität scheint dabei nicht beeinflusst zu sein. Nach Äquilibration des Systems wurde über 2 Platinelektroden ein elektrischer Impuls (15V; 0.3 ms Dauer; 5 Hz) an das Gewebe

abgegeben. Diese elektrischen Impulse führen zu einer Stimulation der enterischen Neurone, in deren Folge es an der Membran als Antwort darauf zu Junctionspotentialen kommt. Sowohl in CB₁^{-/-} als auch in WT Mäusen können dabei IJPs ausgelöst werden. So scheinen die inhibitorischen, neuronal vermittelten Mechanismen am Dünndarm durch den CB₁-Rezeptor nicht, oder allenfalls geringgradig, moduliert zu werden. Eine Blockade inhibitorischer neuronaler Mechanismen liegt definitiv nicht vor, modulierende Effekte geringeren Ausmaßes können wir aufgrund der derzeit geringen Fallzahl nicht definitiv ausschließen.

4.3 Dünndarmtransit der Maus in vivo

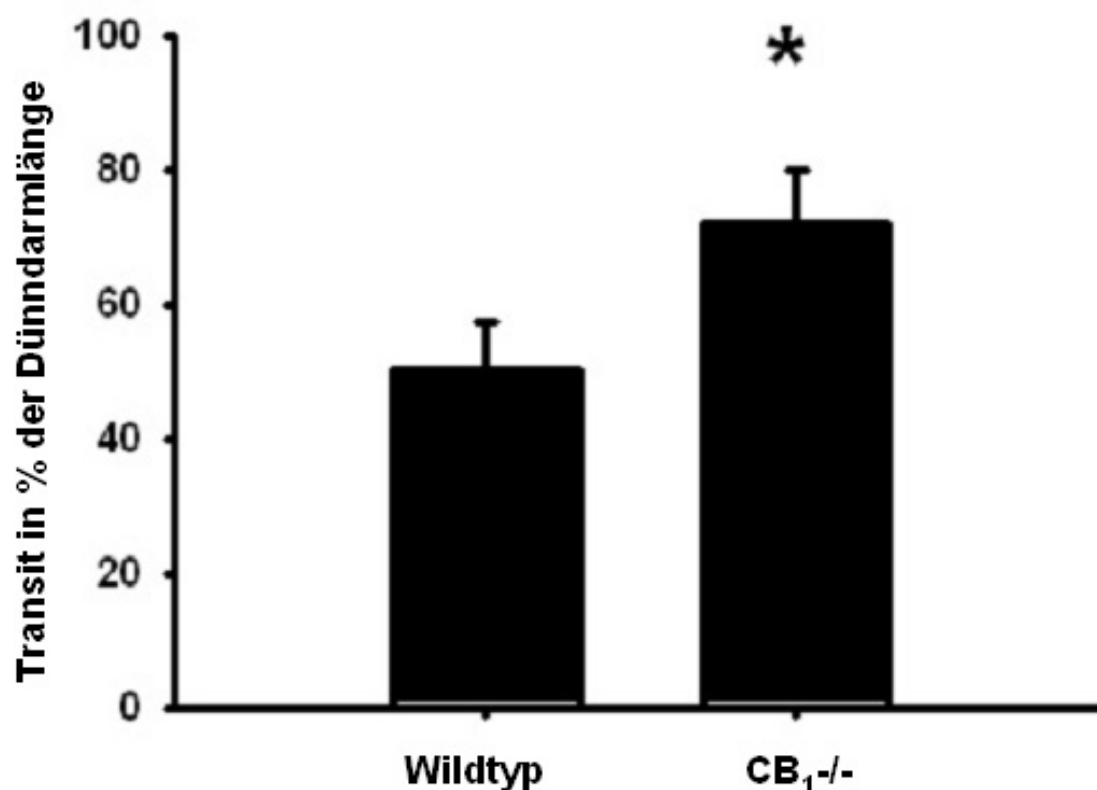


Abbildung 18: Graphische Darstellung des Dünndarmtransits der Wildtyp-Maus im Vergleich zur CB₁-Knockout-Maus. Der Transit der Markersubstanz ist dabei in Verhältnis zur Gesamtlänge des Darmes gesetzt worden. Es zeigt sich eine signifikante Beschleunigung der Dünndarmpassage im Vergleich zur Wildtyp-Maus (*p<0,05)

Im Vergleich zur Wildtyp-Maus zeigt die CB₁ ^{-/-} einen signifikanten beschleunigten Dünndarmtransit einer nicht-resorbierbaren Markersubstanz. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass im Dünndarm der Wildtyp-Maus ein tonisch aktives Endocannabinoidsystem die Motilität hemmt. Dieser Effekt wird wohl durch CB₁-Rezeptoren vermittelt, da im Vergleich der Transit der CB₁-Knockout-Maus um 33% beschleunigt ist. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit den Ergebnissen der Wirkung von AM251 auf die Motilität des Dünndarmes der Ratte.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Daten des Transitversuches

	Wildtyp-Maus	CB₁ -/-
Versuchsanzahl n	8	8
Gesamtlänge Darm in cm	23,0±3	21,5 ±3
Transit in cm (=T)	11,5±2	15,3±2
Prozent der Darmlänge	50%	71%
Prozentuale Zunahme des Transits ((T _{CB-KO} /T _{WT})x100-100)		+33%

5 ALLGEMEINE DISKUSSION

5.1 Dünndarm

5.1.1 Makroskopischer Aufbau

Der Dünndarm ist Teil des Verdauungssystems des Menschen, der schlauchförmig vom Pylorus des Magens bis zur Bauhin'schen Klappe als Übergang zum Kolon reicht. Er ist beim Menschen etwa vier Meter lang und gliedert sich in den Zwölffingerdarm (Duodenum), Leerdarm (Jejunum) und Krummdarm (Ileum). Jejunum und Ileum sind am Mesenterium, einer Bauchfellduplikatur, aufgehängt, die auch die versorgenden Nerven und Gefäße enthält. Das Duodenum liegt retroperitoneal und ist fixiert; es wird durch den Truncus coeliacus und die A. mesenterica superior versorgt.

Die Darmwand ist im gesamten Verdauungssystem nahezu identisch aus mehreren Schichten zusammengesetzt. Lumenseitig ist die Oberfläche der Schleimhaut (Tunica mucosa) durch zahlreiche Zotten und Falten vergrößert und dient hauptsächlich der Resorption von Nahrungsbestandteilen. Dieser liegt die Lamina muscularis mucosae an, die durch ihre Bewegungen zur Bewegung der Schleimhaut beiträgt und somit die Resorption begünstigt. Die Tunica submucosa ist hauptsächlich aus Blutgefäßen, Binde- und lymphatischem Gewebe aufgebaut. Dieser liegt die Muskelschicht (Tunica muscularis), die aus zwei Muskelschichten aufgebaut ist, einer inneren, kräftigen Ringmuskelschicht und einer äußeren dünneren Längsmuskelschicht, auf. Abgeschlossen wird der Wandaufbau nach außen durch die Serosa, die hauptsächlich aus Bindegewebe besteht. Zwischen den verschiedenen Schichten liegen die Nervenzellen des enterischen Nervensystems, die in Form von Plexus zusammengefasst werden. Zwischen Ring- und Längsmuskelschicht liegt dabei der Plexus myentericus (Auerbach), zwischen Ringmuskelschicht und Tunica submucosa der Plexus submucosus (Meissner). Der genaue Aufbau und deren Funktion werden in den nächsten Kapiteln dargestellt.

5.1.2 Mikroskopischer Aufbau

5.1.2.1 Glatte Muskulatur

Die Bezeichnung dieses Muskeltypes richtet sich nach der lichtmikroskopischen Morphologie, der im Gegensatz zur Skelettmuskulatur die Querstreifung fehlt (72).

Glatte Muskeln sind spindelförmig, besitzen einen zentralständigen Zellkern und sind zwischen 50 und 400 μm lang und 2 - 10 μm dick. Sie sind miteinander durch spezielle Zellkontakte, sog. Desmosomen verbunden und außerdem in eine Bindegewebsmatrix eingebettet, die eine für die Kontraktion günstige Längeneinstellung des Muskels bewirkt. So ist die Anpassung an sehr unterschiedliche Dehnungszustände, wie z.B. bei der Harnblase möglich (81).

Prinzipiell kann man die glatte Muskulatur in zwei Haupttypen, den "single unit" -Typ und den "multi unit" -Typ untergliedern, wobei es jedoch viele Mischformen gibt.

Der "single unit" -Typ, zu dem auch die Darmmuskulatur gehört, ist gekennzeichnet durch spezielle, niederohmige Zellkontakte: Nexus oder Gap-junctions, über die elektrische Impulse von Zelle zu Zelle weiter geleitet werden, so dass aus den einzelnen Zellen funktionelle Einheiten entstehen (80;194). Ferner zeichnet sich dieser Typ durch eine spontane rhythmische Aktivität aus (ICC-vermittelt), die durch vegetative Nervenimpulse moduliert wird.

Dem gegenüber steht der sog. "multi unit" -Typ, der sich z. B. im Ziliarmuskel, dem Samenleiter oder dem Irismuskel findet. Hier besitzen die Muskeln zwar ebenfalls die bereits erwähnten Gap junctions, jedoch besitzen sie keine Eigenaktivität, sondern werden überwiegend durch vegetative Neurone erregt bzw. inhibiert.

5.1.2.2 Neuronentypen und Einteilung nach Dogiel

Funktionell kann man die Neurone des enterischen Nervensystem untergliedern in Motoneurone, sensorische Neurone und Interneurone. Alle Populationen sind im Plexus myentericus und submucosus vorhanden.

Die enterischen Neurone werden nach der Klassifikation von Dogiel eingeteilt (67). So werden morphologisch drei unterschiedliche Typen (s. Abb. 19) unterschieden.

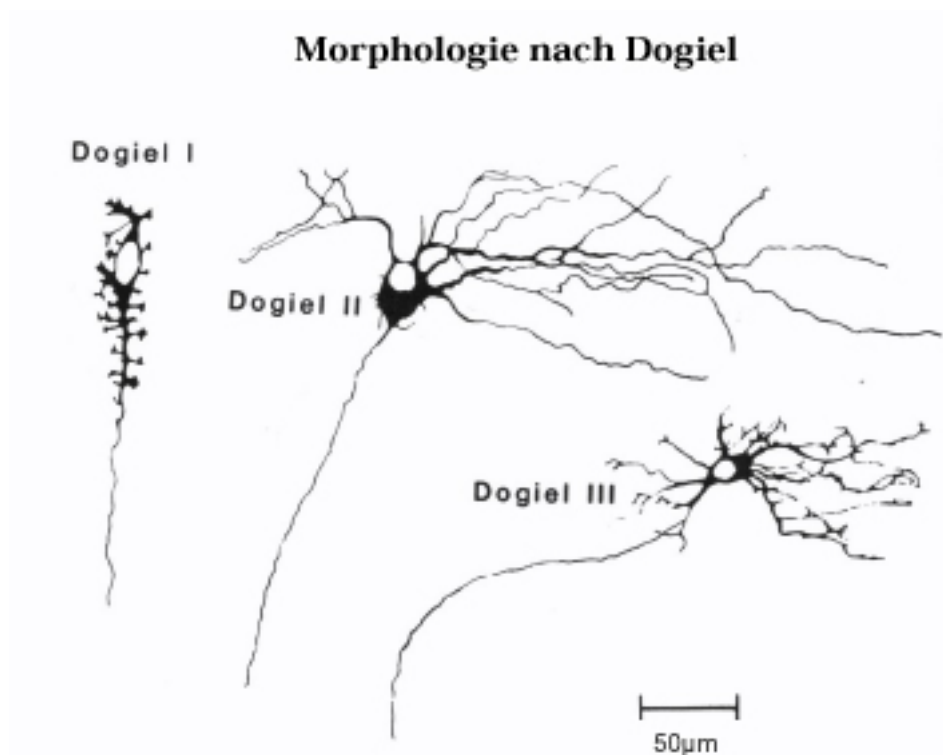


Abbildung 19: Neurone des enteralen Nervensystems. Einteilung nach Dogiel in Typ I bis III. Alle Populationen sind im Plexus myentericus und submucosus vorhanden (67).

Dogiel Typ I Neurone sind uniaxonale Neurone mit einer Vielzahl kleiner Dendriten, die vom Zellkörper ausgehen. Zu ihnen rechnet man vor allem diejenigen Neurone, die zur Muskulatur ziehen. Man bezeichnet sie auch als S-Neurone, da sie ein schnelles exzitatorisches Potential aufweisen. Sie können je nach freigesetztem Transmitter sowohl eine exzitatorische, wie auch eine inhibitorische Wirkung entfalten und repräsentieren Motoneurone.

Dogiel Typ II Neurone besitzen eine glattere Oberfläche mit langen und kurzen Dendriten und einem Axon. In dieser Gruppe findet man sensorische Neurone, die aufgrund einer ausgeprägten Nachhyperpolarisation elektrophysiologisch auch als AH- Neurone (AH=After hyperpolarization) beschrieben werden.

Im Vergleich zu Dogiel Typ II Neuronen besitzt der Dogiel Typ III mehrere kurze Dendriten am Zellkörper. Eine weiterführende Differenzierung der Neurone nach morphologischen Gesichtspunkten ist durch Stach beschrieben worden (185), deren funktionelle Konsequenz jedoch derzeit noch unklar ist.

5.1.2.3 Elektrisches Verhalten des Plexus myentericus

Nach ihren elektrophysiologischen Eigenschaften lassen sich die Neurone in den meisten Abschnitten des enteralen Nervensystems mit Ausnahme des Magens in zwei Gruppen einteilen:

1. AH- (oder Typ-2) Neurone, die ein gegenüber dem Neurotoxin Tetrodotoxin (TTX)-resistentes Aktionspotential und eine langdauernde Nachhyperpolarisation aufweisen. Das Aktionspotential wird bei diesen Zellen durch einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen getragen.
2. S- (oder Typ-1) Neurone, die TTX-sensitive Aktionspotentiale über einen Einstrom von Na^{+} -Ionen generieren (siehe Abb. 20).

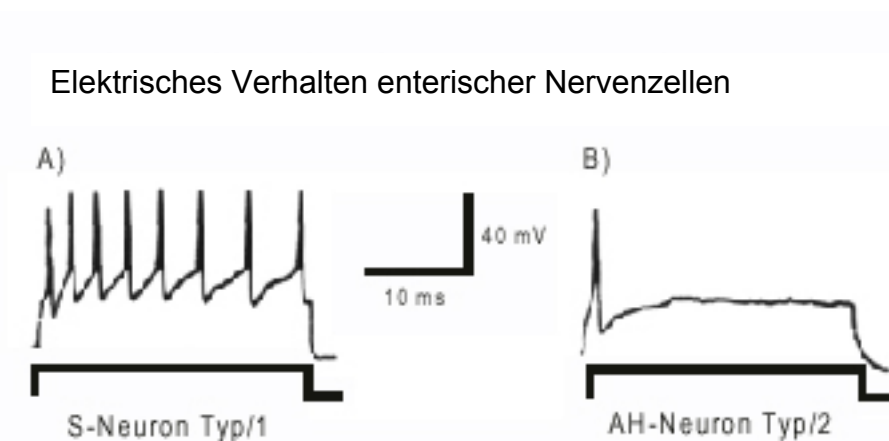


Abbildung 20: Elektrisches Verhalten enteraler Nervenzellen. Differenzierung der Neurone in ein (A) S / Typ 1 Neuron, das nach Depolarisation repetitiv Aktionspotentiale feuern kann, und (B) AH/Typ 2 Neuron, das nach einem Aktionspotential eine lange Nachhyperpolarisation zeigt (210)

5.2 “Interstitial cells of Cajal”

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts beobachtete Cajal im GI Trakt fusiforme und sternförmige Zellen, die einen prominenten Nukleus und variköse Ausläufer aufwiesen, zwischen Nervenendigungen und Effektorzellen lagen und eine Art Netzwerk bildeten. Cajal postulierte, dass diese Zellen eine besondere Art von Neuronen seien, die eine Rolle bei der Neurotransmission spielen (23). Sie wurden später nach ihrem Erstbeschreiber als interstitielle Zellen nach Cajal (ICC) bezeichnet. Es wurde später aber von Taxi gezeigt, dass diese Zellen weder

Neurone noch Schwann- Zellen waren. Dennoch spielen sie durch die enge Lagebeziehung zu varikösen Nervenendigungen eine wichtige Rolle bei der Neurotransmission (193).

So konnte gezeigt werden, dass die ICC eine spontane Rhythmizität aufweisen und für die Generierung von bestimmten Potentialschwankungen, sogenannten "slow waves" verantwortlich sind, die äußerst wichtig für die gastrointestinale Motilität sind (9;52). Diese „slow waves“ werden durch Tetrodotoxin, einem Blocker neuronaler Übertragung nicht beeinflusst (50). Auch konnte gezeigt werden, dass die ICC reich an Mitochondrien sind, was für eine stoffwechselaktive Rolle bei der Motilitätsregulation spricht (119).

Als Bindeglied zwischen ICC und Muskulatur wurden Gap junctions zwischen den beiden Zelltypen entdeckt, die als Übertragungsweg elektrischer Impulse postuliert wurden.

Entscheidend für die enormen Fortschritte in der ICC-Forschung in den letzten zehn Jahren war die Entdeckung, dass interstitielle Zellen das Proto-Onkogen „c-Kit“ exprimieren, das für den Tyrosinkinase-Rezeptor „Kit“ kodiert (20). Damit war ein zuverlässiger immunhistochemischer Marker zur weitgehend selektiven Anfärbung von interstitiellen Zellen und zugleich ein Angriffspunkt für die Manipulation der ICC-Funktion gefunden, da die Entwicklung und vor allem die Differenzierung interstitieller Zellen von der Expression von „Kit“ als Wachstumsfaktor-Rezeptor abhängt.

Der für cKIT kodierende Genabschnitt, der sog. W-Locus, liegt bei der Maus auf Chromosom 5. Es gelang, Mäuse zu züchten, die eine Mutation an dem entsprechenden Locus aufwiesen, so dass die Tiere überlebten, aber kein cKIT mehr exprimierten. Die hinsichtlich des W Locus heterozygoten Tiere (W/W^v) fallen durch ein Fehlen bestimmter ICC- Klassen auf. Daraus ergibt sich das Verschwinden normalerweise vorhandener Slow wave Potentiale, verbunden mit einem abnormen intestinalen Motilitätsmuster (30).

Dies ist konsistent mit den Untersuchungen, dass das Verschwinden von slow waves mit Appräparation der ICC enthaltenden Darmschichten, v.a. zwischen Längs- und Ringmuskulatur sowie durch eine (relativ unspezifische) pharmakologische Blockierung der ICC durch Methylenblau, erzielt werden kann (191).

Die ICC scheinen also mittels der Generierung von slow wave Potentialen essentiell für die Entstehung gastrointestinaler Motilität zu sein. Mittels Immunreaktivität gegen

den cKit Rezeptor konnte die Verteilung der ICC im GI Trakt genauer spezifiziert werden.

5.2.1 Morphologie von ICC

Topographisch liegen ICCs innerhalb der Tunica muscularis des Verdauungskanals. Dort breiten sie sich vom Ösophagus bis zum Anus hin aus. Aufgrund von räumlicher Anordnung und physiologischen Charakteristika lassen sich mehrere Gruppen von ICCs unterscheiden (175) (Abb. 21).

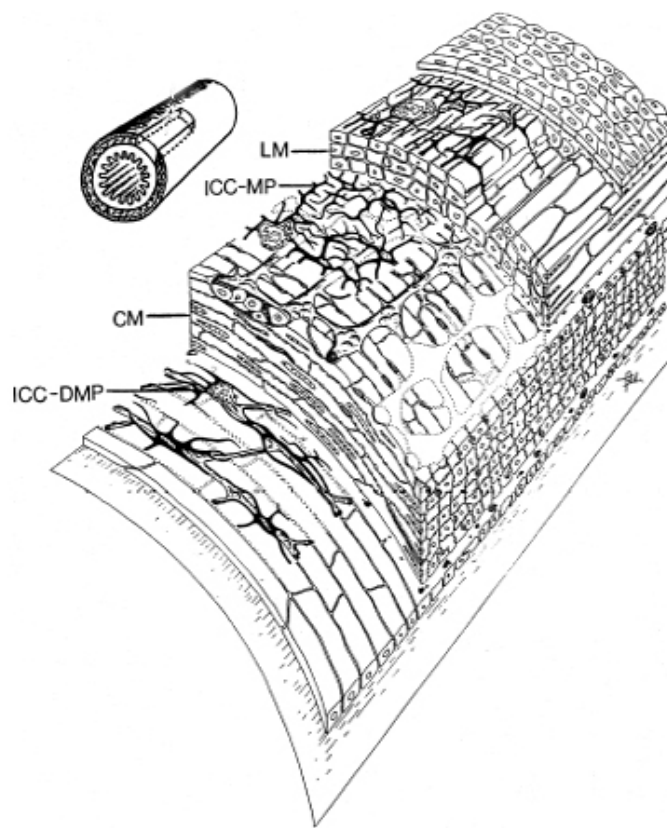


Abbildung 21: Räumliche Anordnung der ICC

Im Bereich des myenterischen Plexus gelegene ICCs (ICC-MY) umgeben netzartig die myenterischen Ganglien und sind über Gap junctions untereinander und an die umgebende Schicht glatter Muskelzellen gekoppelt. ICC-MY generieren rhythmische, lang anhaltende elektrische Wellen, die passiv in die umgebende glatte Muskulatur fortgeleitet werden. Diese „pacemaker“-Funktion führt im Zusammenspiel mit der umgebenden glatten Muskulatur zur Entstehung von charakteristischer „slow wave“-Aktivität (9;90).

Dem gegenüber stehen interstitiell lokalisierte, intramuskuläre Zellen (ICC-IM), die die Mukelzellschichten durchziehen und dabei ein dichtes intramuskuläres Netz bilden. Ihnen wird eine zentrale Rolle als strukturelles und funktionelles Bindeglied zwischen ENS (Enterisches Nerven System) und glatter Muskulatur zugeschrieben. Zwischen Nervenfaserendigungen und Muskelzellen bestehen in den Muskelschichten des Verdauungskanals auffällig lose, räumliche Verbindungen mit neuromuskulären Abständen von bis zu mehreren 100 nm, was eine direkte Neurotransmission nur schwer möglich erscheinen lässt. Dagegen sind enge Kontakte zwischen exzitatorischen wie inhibitorischen Nervenfasern und ICCs vorhanden. Und es bestehen enge Zellkontakte sowie gap junctions zwischen ICCs und Muskelzellen (51).

Ferner konnte gezeigt werden, dass ICCs zahlreiche Rezeptoren für Neurotransmitter, einschließlich muskarinergen Rezeptoren (203), Somatostatin (200), VIP (vasoactive intestinal peptide) - und NK₁ (Neurokinin) -Rezeptoren (70), exprimieren. Zudem reagieren diese auf extrinsische oder intrinsische nitrerge Stimulation mit gesteigerter cGMP-Bildung und stellen somit eine Zielstruktur für neuronales NO (Stickstoffmonoxid) dar. In Mäusen mit verringerter Tyrosinkinaseaktivität (natürliche Mutante mit Blockierung des „Kit“-abhängigen Pathways), die keine ICC-IM u.a. im Bereich des Magens enthalten, wurde eine deutliche Verringerung inhibitorischer postsynaptischer Potentiale nach elektrischer Stimulation und eine deutliche Abschwächung der durch exogenes NO hervorgerufenen Hyperpolarisation glatter Muskulatur gemessen (65). Dies weist auf eine zentrale Rolle interstitieller Zellen in der inhibitorischen Neurotransmission hin.

Auch exzitatorische, ChAT (Cholinazetyltransferase) - oder SP (Substanz P) -positive Nervenfasern stehen in engem, synapsenähnlichem Kontakt zu intramuskulären interstitiellen Zellen (195;202). Trotz unveränderter Nervenfaserdichte waren in den Tyrosinkinasemutanten durch cholinerge Stimulation kaum mehr exzitatorische postsynaptische Potentiale nachweisbar (204), so dass auch in der exzitatorischen neuromuskulären Signalübertragung ICC-IM eine entscheidende Rolle einzunehmen scheinen.

Eine dritte Gruppe interstitieller Zellen findet sich innerhalb des „deep muscular plexus“ des Dünndarms und wird daher als ICC-DMP bezeichnet. Funktionell entsprechen diese ICCs weitgehend dem intramuskulären Typ (ICC-IM).

In Zusammenschau deuten die derzeit vorliegenden Ergebnisse auf eine zentrale Rolle interstitieller Zellen in der Generierung und Modulation gastrointestinaler Neurotransmissions- und Motilitätsvorgänge hin. Über eine evt. pathophysiologische Bedeutung interstitieller Zellen bei der Entstehung verschiedenster Motilitätsstörungen kann bislang nur spekuliert werden.

5.3 Neuromuskuläre Interaktion im Gastrointestinaltrakt

Alle Funktionen des Gastrointestinaltrakts unterliegen komplexen Kontrollmechanismen, die über ein eigenständiges, in der Wand des Gastrointestinaltrakts lokalisiertes Nervensystem, das enterische Nervensystem (ENS), reguliert werden (209). Die Existenz dieses Nervensystems ist seit weit über hundert Jahren bekannt. Die ersten Untersuchungen beschränkten sich damals auf die anatomisch-morphologischen Eigenschaften. Von Meissner und Auerbach wurden 1857 bzw. 1862 (6) zwei in der Darmwand lokalisierte Nervenplexe beschrieben; der zwischen Zirkulärmuskulatur und Mukosa liegende submuköse Plexus, welcher vor allem die Mukosafunktionen koordiniert, und der zwischen Zirkulär- und Längsmuskulatur gelegene myenterische Plexus, der für die Muskelfunktionen verantwortlich ist (Abb. 22).

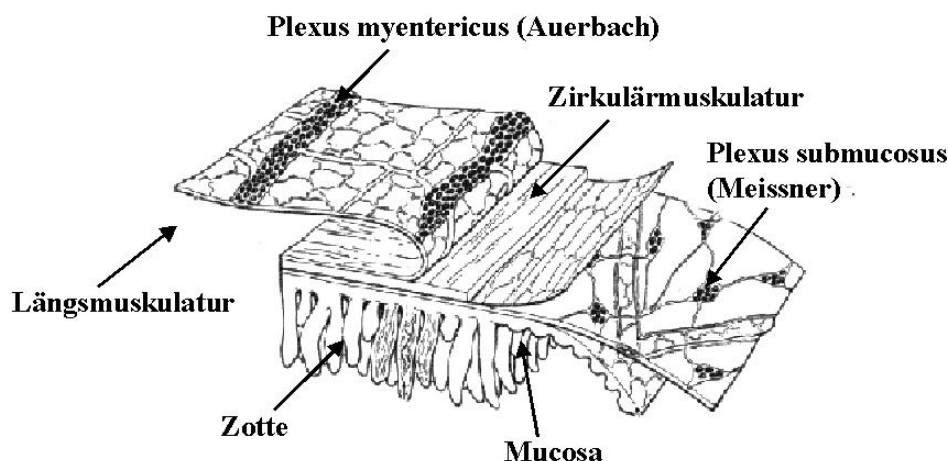


Abbildung 22: Enterales Nervensystem. Der Plexus myentericus befindet sich zwischen der Längs- und Zirkulärmuskulatur des Magen-Darm-Trakts. Der Plexus submucosus ist zwischen Zirkulärmuskulatur und Mucosa lokalisiert (79)

Beide Plexus bestehen aus Nervenzellen, die in Ganglien variabler Größe organisiert sind. Ein dichtes Netzwerk von Fasersträngen verbindet die enterischen Nervenzellen untereinander und mit den Effektororganen bzw. mit anderen Teilen des autonomen Nervensystems. Bis zur Jahrhundertwende wurde das ENS als ein diffuses parasympathisches Ganglion angesehen, in dem direkte synaptische Verbindungen zwischen präganglionären extrinsischen Nervenfasern und postganglionären Motoneuronen die Basis für die Kontrolle gastrointestinaler Funktionen darstellten. Der eigentliche Begriff enterisches Nervensystem wurde erst von Langley 1921 eingeführt, um dieses in der Darmwand lokalisierte neuronale Netzwerk vom sympathischen und parasympathischen Nervensystem abzugrenzen. Langley verwendete diesen Begriff, da er überzeugt war, dass enterische Ganglien einzigartige und besondere funktionelle Charakteristika aufweisen, die sie von anderen autonomen Ganglien außerhalb des Gastrointestinaltrakts unterscheiden. Heute ist die Unterteilung des autonomen Nervensystems in drei unabhängige Teilsysteme, das sympathische, das parasympathische und enterische Nervensystem etabliert. Langley's konzeptioneller Ansatz basierte auf zwei Beobachtungen. Zum einen war ihm schon damals bekannt, dass die Anzahl enterischer Nervenzellen die Zahl der den Darm versorgenden extrinsischen sympathischen und parasympathischen Nervenfasern bei weitem übersteigt. Einigen tausend extrinsischen Nervenfasern stehen mehrere 100 Millionen enterische Nervenzellen gegenüber. Das enterische Nervensystem ist damit die größte Ansammlung von Nerven außerhalb des Gehirns und besitzt sogar mehr Nervenzellen als das Rückenmark.

Zum anderen begründete Langley die Eigenständigkeit des ENS mit der Beobachtung, dass selbst in einem isolierten Dünndarmsegment *in vitro* die gerichtete Propulsion eines intraluminalen Bolus zu beobachten war (124). Diese intestinale Propulsion wird verursacht durch eine Muskelkontraktion oral und eine Muskelrelaxation anal des Stimulus. Dieser Reflex wurde aufgrund seiner grundlegenden Bedeutung für den Magen-Darmtrakt 1899 schon von Bayliss und Starling als "law of the intestine" bezeichnet (10). Der peristaltische Reflex kann sowohl durch mechanische Stimulierung der Muskulatur oder der Mukosa als auch

durch chemische Stimuli im Darmlumen ausgelöst werden (10). Die funktionelle Bedeutung des peristaltischen Reflexes liegt in der Gewährleistung eines anal gerichteten Transports des Chymus. Die heutigen Konzepte betrachten das ENS als ein unabhängiges, integratives System, welches strukturell und funktionell Ähnlichkeiten zum zentralen Nervensystem (ZNS) aufweist (210). So enthält das ENS eigene sensorische Neurone, Interneurone und Motoneurone. Sensorische Neurone kodieren als Chemo- oder Mechanorezeptoren verschiedene Stimuli, die auf die Magendarmwand einwirken, und leiten die Information innerhalb des ENS weiter. Interneurone leiten diese Information weiter und regulieren die Erregbarkeit der Motoneurone, die dann letztendlich die Aktivität der Muskulatur und der Mukosa modulieren (210).

Aufgrund seiner Komplexität und der funktionellen und strukturellen Ähnlichkeit zum Gehirn wird das ENS auch als "little brain of the gut", oder als "Darmhirn", bezeichnet. Das ENS ist durch verschiedene intrinsische Reflexe fähig, die zahlreichen Funktionen des Magen-Darmtrakts, wie motorische und sekretorische Vorgänge, Durchblutung und Modulation von Immunvorgängen zu steuern (39;40;78;210). Die Funktion extrinsischer sympathischer oder parasympathischer Nervenfasern besteht primär darin, enterische Schaltkreise zu modulieren. Dieses Konzept der permissiven Rolle des extrinsischen Nervensystems ermöglicht dem Sympathikus und Parasympathikus, die motorische und sekretorische Aktivität des Magen-Darmtrakts in beschränktem Umfang zu beeinflussen (97;177). Erst in den 80er Jahren erfolgte durch den Einsatz elektrophysiologischer Techniken die neurophysiologische Charakterisierung des ENS (98;156).

Intrazelluläre Ableitungen von enterischen Nervenzellen ermöglichten die Charakterisierung ihrer elektrischen und synaptischen Eigenschaften und bestätigten die Komplexität der Verschaltungen innerhalb des ENS. Elektrophysiologisch unterschieden sich mehrere Zellpopulationen. Als besonders bemerkenswerter Befund zeigte sich, dass das ENS, ähnlich wie das ZNS, über das gesamte Repertoire an hemmenden und aktivierenden synaptischen Mechanismen verfügt, um interneuronale und neuromuskuläre Interaktionen aufrechtzuerhalten. Im Laufe der letzten Jahre erfolgte durch die Anwendung und Kombination elektrophysiologischer, neurochemischer und neuropharmakologischer Techniken die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung unterschiedlicher Nervenpopulationen im ENS. Bis heute sind über 20 Neurotransmitter und weitere

Neuromodulatoren identifiziert, die an der Vermittlung der synaptischen Vorgänge im ENS beteiligt sind (147). Damit besitzt das ENS eine breite Palette von Neurotransmittern, die einzelne Effektorsysteme, wie die glatte Muskulatur, hemmen oder aktivieren können.

Trotz der enormen Anzahl an Neurotransmittern, die theoretisch mehrere hundert Kolokalisationsmuster zulassen, existieren im ENS nur ca. 20 Populationen, die sich durch eine spezifische Kodierung (chemical coding) auszeichnen. Dabei existiert jedoch eine Variabilität des Innervationsmusters und des neurochemischen Kodes je nach Region, was darauf hinweist, dass sich das ENS auf spezifische Funktionen der verschiedenen Regionen des Magen-Darmtrakts adaptiert hat. Des weiteren existieren zum Teil erhebliche spezie-spezifische Unterschiede, obwohl die Funktionen der entsprechenden Regionen des Magen-Darmtrakts vergleichbar sind (36). Die Kenntnisse über die Neurotransmitterkodierung der Nervenzellen basieren primär auf Untersuchungen am Meerschweinchendarm (39).

Die wichtigsten exzitatorischen Transmitter, die zu einer Aktivierung der glatten Muskulatur führen, sind Acetylcholin und die Neurokinine, darunter das Neuropeptid Substanz P. Die inhibitorischen Transmitter, die zu einer Hemmung der glatten Muskulatur führen, sind Stickstoffmonoxid (NO), Adenosin 5'-Triphosphat (ATP), Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) und Adenylatzyklase Aktivierendes Polypeptid (PACAP "Pituitary Adenylat Cyclase Activating Polypeptide").

Die Voraussetzung einer funktionierenden Motilität im Magen-Darmtrakt ist ein optimal abgestimmtes Zusammenspiel von sowohl hemmend als auch erregend wirkenden nervalen Regulationsmechanismen. Als Hauptkomponente des erregenden Mechanismus ist Acetylcholin bekannt. Das Acetylcholin wird hierbei nicht von parasympathischen Nervenfasern, sondern fast ausschließlich von Nervenzellen des ENS ausgeschüttet. Der hemmende Mechanismus wird durch Freisetzung von mehr als einem Neurotransmitter vermittelt (41;48;137).

Die Zirkulärmuskulatur wird bei allen bisher untersuchten Spezies sowohl von erregenden als auch von hemmenden Motoneuronen innerviert. Die Innervation der Längsmuskulatur erfolgt, zumindest im Dünndarm kleiner Labortiere, primär durch erregende cholinerge Motoneurone des ENS (17;31). Die Längsmuskulatur enthält bei diesen Spezies keine direkte, hemmende Innervation, sondern relaxiert passiv als Folge einer Kontraktion der Zirkulärmuskulatur. Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise,

dass die Längsmuskulatur im Kolon dieser Tiere durch hemmende Motorneurone des ENS reguliert wird und damit auch aktiv relaxieren kann (183;184;187).

Die funktionelle Bedeutung und die Wirkungsweise der Neurotransmitter kann an isolierten Magen- bzw. Darmpräparaten untersucht werden. In isolierten Darmpräparaten können enterische Nerven selektiv elektrisch gereizt werden, um die Ausschüttung ihrer Transmitter zu stimulieren. Die elektrische Feldstimulation führt in den meisten Fällen zu einer Mischantwort, die aus hemmenden und erregenden Komponenten besteht. Obwohl die zeitliche und räumliche Differenzierung durch diese Art der Stimulation verloren geht, spiegeln die Antworten die Vorgänge wider, die auch bei der Initiierung des peristaltischen Reflexes ablaufen. Die Wirkungen der verschiedenen Neurotransmitter auf die Aktivität der glatten Muskulatur kann dann registriert und neuropharmakologisch analysiert werden. Dabei untersucht man die Wirkung der Agonisten bzw. verschiedener rezeptorspezifischer Antagonisten auf die durch elektrische Stimulation induzierte Muskelantworten bzw. deren Wirkung auf die durch exogene Applikation der Neurotransmitter hervorgerufenen Motilitätsänderungen. Solche Untersuchungen erlauben die Differenzierung verschiedener Komponenten, da die durch elektrische Stimulation induzierte Antwort immer auf der Ausschüttung eines Transmittercocktails basiert.

5.4 Motilität des Magen-Darm-Traktes

Elektrische oder mechanische Stimulation des Dünndarms führt zur Auslösung des peristaltischen Reflexes in Form einer aszendierenden Kontraktion und einer deszendierenden Relaxation gefolgt von einer Kontraktion. Die aszendierende Kontraktion wird vermutlich durch die Aktivierung von cholinergen Neuronen, jedoch auch durch serotonerge Neurone gesteuert (61). Die deszendierende Relaxation wird durch nicht-adrenerge, nicht-cholinerge (NANC) Neurone vermittelt (42).

5.5 Der myenterische Reflex

Der myenterische Reflex führt bei einem entsprechenden Reiz, wie z.B. Dehnung der Darmwand durch einen Nahrungsbolus oder mechanische oder chemische Reizung der Mukosa, zu Kontraktionen und Relaxationen sowohl der longitudinalen als auch der zirkulären Muskulatur des Darmes und somit zum Weitertransport des Nahrungsbreis (Propulsion). Während die Pendelbewegungen der longitudinalen Muskulatur nur wenig der Propulsion, sondern eher der suffizienten Durchmischung

des Darminhaltes dienen, stellt dieser Weitertransport die Hauptaufgabe der zirkulären Muskulatur dar.

Die Propulsion des Nahrungsbolus wird erreicht durch eine deszendierende aborale Relaxation und einer darauffolgenden aszendierenden oralen Kontraktion der zirkulären Muskulatur.

Es existieren mehrere Mechanismen zur Auslösung des Darmreflexes durch verschiedene initiale Reize. Grundsätzlich kann man zwischen mechanischen und chemischen Reizen auf die Mukosa und einer Dehnung der Darmwand unterscheiden. Während eine Vielzahl von Stimuli gefunden werden konnte, bereitet die Aufklärung, wie die Perzeption stattfindet, immer noch Schwierigkeiten. Spekulationen reichen von Mechano- und Chemorezeptoren in der Darmwand über eine Spreizung von Nervenfasern bis hin zu spezialisierten becherartigen Zellen der Mukosa. Mechanorezeptoren ähnlich denen, die in der Haut vorkommen, konnten jedoch nicht gefunden werden. Auch freie Nervenendigungen, die als Chemorezeptoren fungieren könnten, waren bisher nicht nachweisbar.

Am wahrscheinlichsten dienen also spezialisierte becherartige enterchromaffine Zellen der Mukosa der Perzeption von Reizen an der Schleimhaut. Diese Zellen sind so gebaut, dass auf einer Seite einige Pili in das Darmlumen ragen. Nach Abscherung dieser Pili kommt es zu einer Neurotransmitterfreisetzung von 5-Hydroxytryptamin (5-HT), das ein Neuron erregt. Es handelt sich hierbei um einen Effekt, der über 5-HT_{1P}-Rezeptoren vermittelt wird und durch einen entsprechenden Antagonisten blockiert werden konnte. Als intrinsisches, primär afferentes Neuron für die mucosavermittelte chemische und mechanische Reizung konnten AH/Dogiel II Neurone gefunden werden. Zusätzlich ist die Reflexauslösung durch eine Dehnung der Darmwand möglich. Auch hier konnten Dogiel Typ II-Neurone nachgewiesen werden, die als intrinsisch primäres Neuron auf Dehnung reagieren. Diese intrinsischen primär afferenten Neurone sind Motoneurone von monosynaptischen Reflexbahnen oder Interneurone von polysynaptischen Reflexbahnen, die dann ihrerseits Motoneurone erregen.

5.6 Aszendierender exzitatorischer Reflex

Ein adäquater Stimulus führt vermutlich über einen der oben genannten Wege zu einer Aktivierung eines aszendierenden Neurons. Als Transmitter dieses Neurons kommen z.B. Substanz P, CGRP (calcitonin gene related peptid) oder Serotonin in

Frage. Dieses Neuron aktiviert ascendierende cholinerge Interneurone, die wiederum exzitatorische lange und kurze Motoneurone erregen. Diese ziehen zur zirkulären Muskulatur und innervieren diese über muskarinerg-cholinerge Neurone. Als die entscheidenden Neurotransmitter der exzitatorischen Motoneurone im Gastrointestinaltrakt werden Acetylcholin und Tachykinine, wie z.B. Substanz P und Substanz K, angesehen.

5.7 Cannabinoide

Hanf (*Cannabis*) ist eine Pflanzengattung aus der Familie der Hanfgewächse. Manche Autoren gehen von einer einzigen Art *Cannabis sativa* aus, während andere die Gattung in drei Arten der *C. sativa*, *indica* und *ruderalis* unterteilen. Als Medizinalhanf wird hauptsächlich *C. sativa* angesehen. Δ^9 -THC, der psychoaktive wirksame Bestandteil der Hanfpflanze, ist überwiegend in den blühenden Spitzen der weiblichen Pflanze konzentriert und nimmt bis zu den Samen hin ab. Die Zubereitung von Pflanzenbestandteilen zum Konsum als Rauschmittel erfolgt auf unterschiedliche Weise. So wird beispielsweise Marihuana (THC Gehalt =0.5-5%) aus den getrockneten Blüten und den Blättern hergestellt, während Haschisch (THC Gehalt=2-20%) aus getrocknetem Harz und gepressten Blüten besteht (2).

Es sind derzeit 426 chemische Inhaltstoffe der Hanfpflanze bekannt, darunter werden etwa 60 den Cannabinoiden zugerechnet (197). Diesen gemeinsam ist eine trizyklische Struktur bestehend aus einem Phenolring mit einer Pentylgruppe in Metastellung, einem zentralen Pyranring und einem einfach ungesättigten Cyclohexylring (149), diese werden zusammenfassend auch als klassische Cannabinoide bezeichnet. Herausragende Bedeutung und intensive Erforschung gelten dabei, Cannabinol, Cannabinodiol, Δ^8 -Tetrahydrocannabinol und Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, das hauptsächlich für die psychoaktiven Wirkungen verantwortlich ist (150). (Abb. 23)

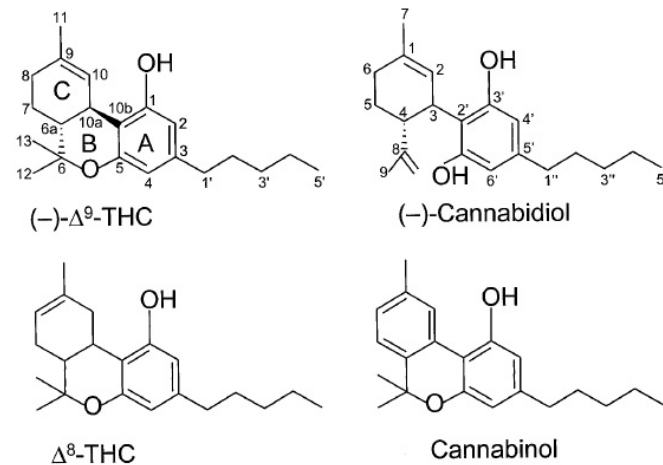


Abbildung 23: Strukturformeln von ausgewählten natürlichen Cannabinoiden (101)

Bereits Anfang des 19. Jahrhunderts wurde versucht, eine chemische Analyse der Hanfpflanze, die sich jedoch aufgrund des flüchtigen Charakters vieler Inhaltstoffe als schwierig erwies, durchzuführen. Erst Anfang der 60er gelang mit der Strukturanalyse von Cannabidiol der Durchbruch. Kurz darauf konnte die Struktur von Δ⁹-Tetrahydrocannabinol aufgeklärt werden (153). Der überwiegende Teil der Cannabinoide konnte dann Mitte der 70er Jahre isoliert und dargestellt werden (152). Nachdem die Strukturen der natürlichen Cannabinoide aufgedeckt waren, dienten diese als Ausgangsstoffe zur Herstellung synthetischer Analoga und somit als potentielle Therapeutika (142). Neben diesen klassischen gibt es auch eine Serie von nicht-klassischen bi-/tri-zyklischen Cannabinoiden, die durch die Firma Pfizer, USA zur Anwendung als nicht-opioid Analgetika hergestellt wurden. Es kam jedoch nicht zu einer Markteinführung (113). Über CP47497 der Ausgangssubstanz dieser Reihe, wurde dann CP55940 einer der am häufigsten genutzten experimentellen Substanzen entwickelt (Abb. 24 links). Diese Stoffe waren aufgrund Ihrer geringeren Lipophilie als auch der stärkeren Rezeptoraffinität ideale Stoffe zur Erforschung des Cannabinoidsystems und führten schließlich auch zur Entdeckung des CB₁-Rezeptors. Eine andere Gruppe von CB-Rezeptor-Agonisten, ihrer chemischen Struktur nach als Aminoalkyindole zusammengefasst, konnte mit WIN 55,212-2 als Prototyp durch das Sterling Research Institut entdeckt werden (35) (Abb. 24 rechts).

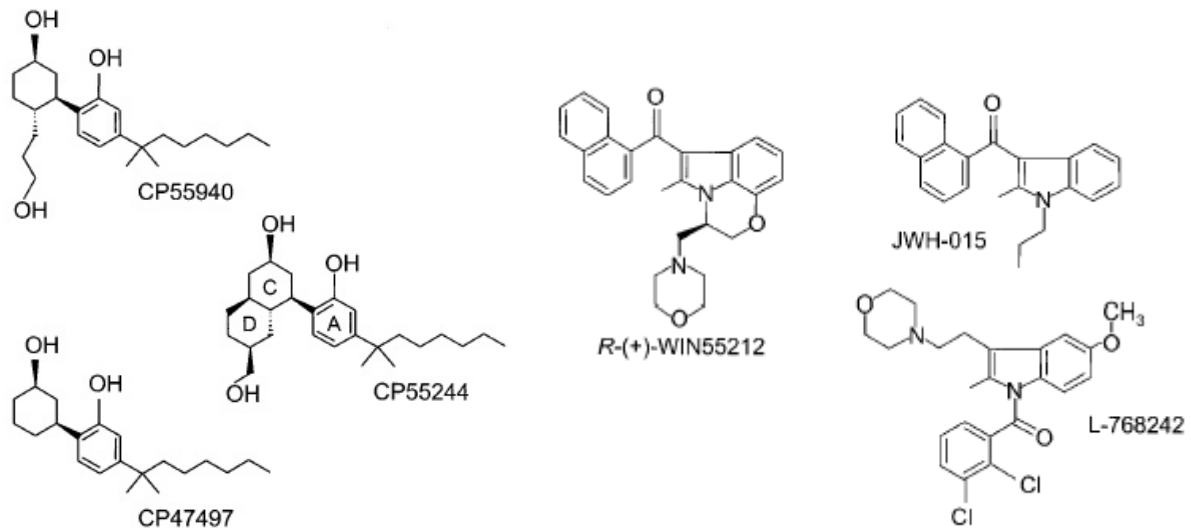


Abbildung 24: Links dargestellt die Strukturformeln von bi-/trizyklischen synthetischen nicht-klassischen Cannabinoiden. Rechts die Strukturformeln der Aminoalkylindole (101)

Durch diese Stoffe konnte schließlich nachgewiesen werden, dass körpereigene Rezeptoren existieren, die eine hohe Spezifität für Cannabinoide aufweisen, diese sollen in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden. Der Nachweis dieser Rezeptoren warf natürlich die Fragen nach körpereigenen Liganden auf, die auch tatsächlich in den darauf folgenden Jahren entdeckt werden konnten. Diese wurden zusammenfassend als Endocannabinoide bezeichnet. Ihre Form und der Metabolismus sollen im nächsten Kapitel erläutert werden.

5.7.1 Endocannabinoide (Eicanoside)

Als Liganden der Cannabinoid-Rezeptoren konnten bisher einige verschiedene Fettsäurederivate, die als Endocannabinoide bezeichnet werden, nachgewiesen werden. Anandamid das erste dieser Gruppe wurde 1992 isoliert (60), gefolgt von 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) (151). In den vergangenen zwei Jahren konnten Noladin, Virodhamin (O-Arachidonylethanolamin), N-Arachidonoyldopamin (NADA) und Docosatetraenylethanolamid (DEA) zu dieser Gruppe ergänzt werden (Abb. 25).

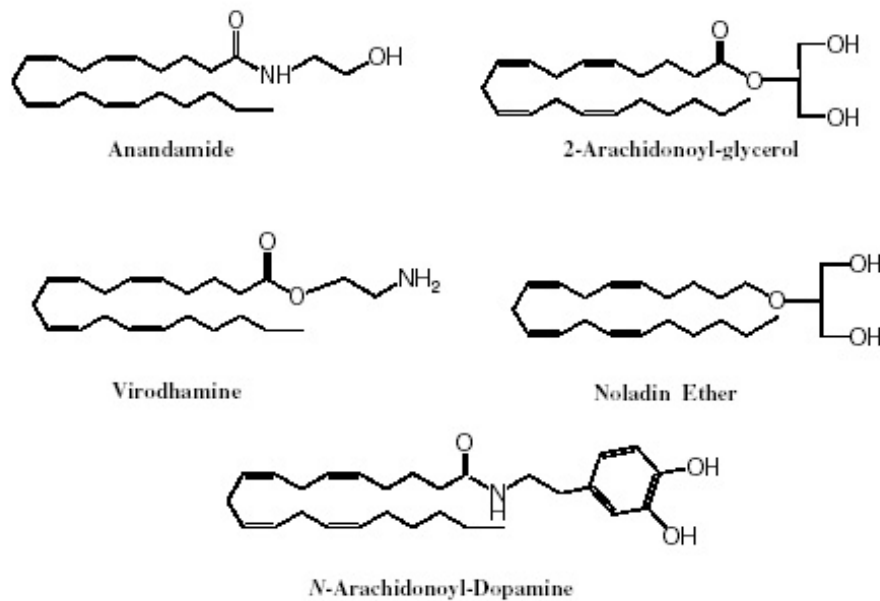


Abbildung 25: Strukturformeln der endogenen Cannabinoide (55)

Diese Stoffe binden zwar an die Cannabinoid-Rezeptoren, jedoch sind Ihre genauen physiologischen Bedeutungen bisher nicht ausreichend geklärt (75;201). Die am besten untersuchten Stoffe sind Anandamid und 2-AG (189). Beide werden durch den Körper bei Bedarf aus membrangebundenen Vorstufen durch Phospholipase D und C gebildet und können Cannabinoid-Rezeptoren stimulieren. Anandamid und NADA können zusätzlich an den Vanilloid-Rezeptor binden. Der Abbau von Anandamid und 2-AG scheint mit der Aufnahme in Zellen durch einen selektiven, sättigbaren, temperaturabhängigen und Na^+ -unabhängigen Transporter, der als Anandamid Membran Transporter (AMT) (12;63;76;132) bezeichnet wird, zu beginnen. Dieser scheint durch NO aktiviert zu werden (131). Diese Eigenschaften konnten durch Versuche an einer Vielzahl von Zellreihen nachgewiesen werden.

Tabelle 10: Übersicht von verschiedenen Zelllinien an denen eine intrazelluläre Aufnahme von Anandamid nachgewiesen werden konnte

Zelllinie	Aufnahme	Referenz
RBL-2H3	+	(14)
U937 Lymphomzellen	+	(132)
CHP 100 Neuroblastomzellen	+	(132)
N18TG2 Neuroblastomzellen	+	(58)
CCF-STTG1 Astrozytomzellen	+	(11)
Granuläre Zellen des Kleinhirns	+	(95)
Neuronen des Striatum, Astrozyten	+	(63)
Kortikale Neurone	+	(73)

Es scheint, dass dieser Mechanismus auch für die Aufnahme der bisher entdeckten weiteren Endocannabinoide verantwortlich ist; dies wurde jedoch bisher noch nicht eindeutig durch Versuche belegt (75;102;208). Obwohl dieser Transporter noch nicht geklont werden konnte, gibt es doch Hinweise für seine Existenz.

So wurden Substanzen entwickelt, die die Aufnahme von Anandamid, jedoch nicht den enzymatischen Abbau hemmen (73;129;159). FAAH Inhibitoren erhöhen, AMT-Hemmer senken den Gehalt von Anandamid in Zellen (115). In der Zelle erfolgt die Inaktivierung durch die Hydrolyse durch FAAH (fatty-acid-amide-hydrolase) für Anandamid und 2-AG oder eine Monoacylglycerol Lipase für 2-AG (59;66). Auch für FAAH gibt es eine Reihe von Hemmstoffen unterschiedlicher Selektivität (59). Es scheint, daß das kürzlich entdeckte Cannabinoid Noladin hauptsächlich durch Acylierung abgebaut wird (75). FAAH wird stark in der Leber gebildet und ist am Abbau von Oleamid involviert, einer endogenen Cannabinoid-verwandten schlafinduzierenden Substanz. FAAH spaltet Anandamid in Arachidonsäure und Ethanolamin, die keine Affinität zu den CB-Rezeptoren haben (59). Durch die Entdeckung weiterer Hemmstoffe des Cannabinoid-Metabolismus wird sicherlich die Funktion dieser Stoffe weiter erforscht werden können (Abb. 26).

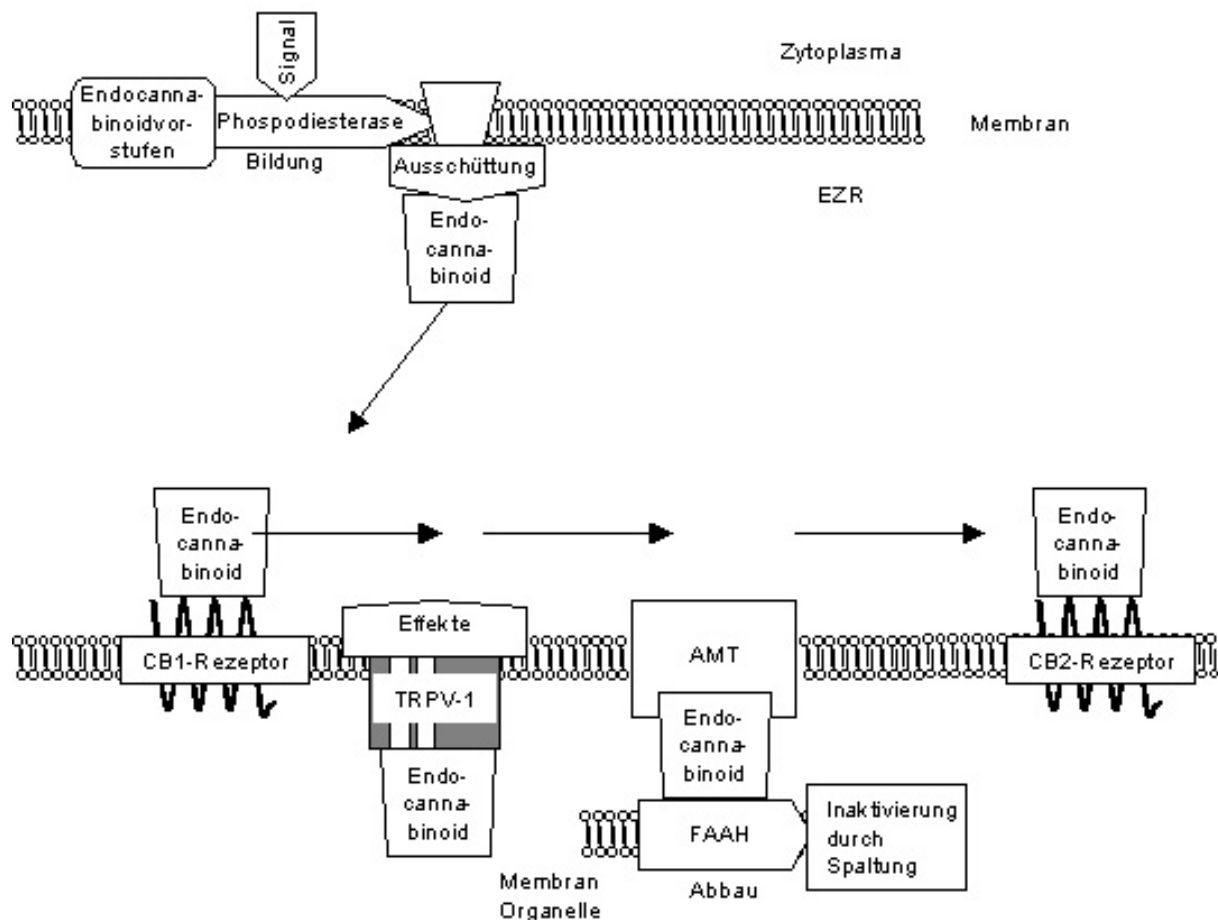


Abbildung 26: Aufgeführt sind schematisch die Stoffwechselvorgänge des Endocannabinoid-Metabolismus und Möglichkeiten der pharmakologischen Beeinflussung.

5.7.2 Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten

Die Antagonisten am CB₁- und CB₂- Rezeptor werden der chemischen Gruppe der Diazolpyrazole zugeordnet. Als Hauptvertreter gelten dabei die von Sanofi hergestellten Antagonisten. Der selektive CB₁-Rezeptor Antagonist ist dabei SR141716A (Rimonabant), wohingegen am CB₂-Rezeptor SR144528 wirkt. Diese Stoffe hemmen die Wirkung von CB₁- bzw. CB₂- Rezeptoren an den jeweiligen Rezeptoren (171;172). Es weist aber auch vieles darauf hin, dass diese Antagonisten nicht ausschließlich rein antagonistische, sondern auch zu den Cannabinoiden gegensätzliche Wirkungen aufweisen (160). Es sprechen einige Versuchsergebnisse dafür, dass die Antagonisten an den Rezeptoren selbst als inverse Agonisten wirken könnten und nicht nur als reine Antagonisten (16;44;135;172;174;180). Die antagonistische Wirkung scheint dabei die invers-agonistische Wirkung zu übertreffen (85;180), vermutlich durch die höhere Affinität

an der Agonisten-Bindungsstelle des Rezeptors. Es ist auch möglich, dass die Cannabinoid-Rezeptoren nicht nur rein inverse agonistische Wirkung haben, sondern ein tonisch aktives Endocannabinoidsystem, das physiologischerweise durch die Ausschüttung von Endocannabinoiden aktiv ist, hemmen. Auch für diese Vermutung gibt es experimentelle Hinweise.

Zwei Analoga von SR141716A wurden ebenfalls zur Hemmung von CB-Rezeptoren genutzt, AM251 und AM281. Beide Substanzen scheinen dabei ebenfalls wie SR141716A gegensätzliche Wirkung zu den Antagonisten zu entfalten, (3;37;86;103;106;136;182;207) als auch selbst inverse agonistische Wirkung zu haben (37;86;106). (Abb. 27)

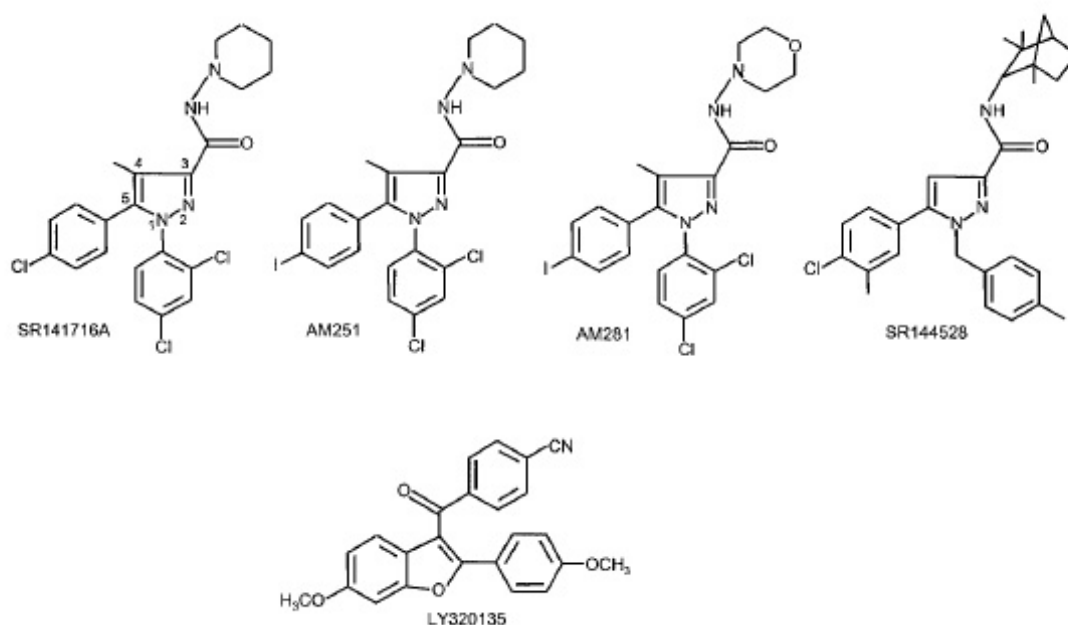


Abbildung 27: Oben Strukturformeln der Diazylpyrazole mit antagonistischer Wirkung an den CB-Rezeptoren. Unten eine weitere chemische Substanz mit antagonistischer Wirkung jedoch nicht zu den Diazylpyrazole gehörend (101).

Erwähnenswert sind noch zwei weitere chemische Substanzen mit antagonistischer Wirkung an Cannabinoid-Rezeptoren. Zum einen das von der Firma Eli Lilly hergestellte substituierte Benzofuran LY320135, zum anderen das Aminoalkyindol 6-Iodpravodolin (AM630). LY320135 hat dabei eine höhere Selektivität zum CB₁-Rezeptor, jedoch eine geringere Affinität als SR141716A. Zusätzlich bindet es an muskarinerge und 5-HT₂-Rezeptoren (74). Ähnlich wie die anderen Antagonisten weist es die gleichen invers-agonistischen Eigenschaften (32;74) als auch die gegensätzliche Wirkung zu den Agonisten auf (32;74).

AM630 ist ein CB₂-selektiver inverser Agonist/Antagonist, mit einer geringeren agonistischen Wirkung als SR144528 (174). Zusätzlich gibt es widersprüchliche Aussagen zum Verhalten am CB₁-Rezeptor. Einerseits wird beschrieben, dass es hier als partieller Agonist wirkt (174), in einer anderen Arbeit wiederum scheint es auch als niedrig-potenter inverser Agonist am CB-Rezeptor zu wirken (123).

Tabelle 11: Ausgewählte Übersicht über Cannabinoide und ihre direkten und indirekten Antagonisten (21;55;101;128;148)

Natürliche Cannabinoide
Δ^8 -Tetrahydrocannabinol
Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
Cannabinol
Cannabidiol
Klassische synthetische Cannabinoid- CB₁-selektiv
11-hydroxy-8-THC-dimethylheptyl (HU-210)
HU 211
Desacetyl-L-Natradol
Klassische synthetische Cannabinoide - CB₂-selektiv
HU-308
L-759633
JWH-133
L-759656
JWH-139
JWH-051
Nicht-klassischen bi-/trizyklischen Cannabinoide
CP 55244
CP 55940
CP 47497
Aminoalkylindole
WIN-55,121-2
JWH-015
L-768242
Endogene Cannabinoide (Eicenoside)
Anandamid
2-AG
Virodhamin
Nolandin
N-archidonoyldopamine (NADA)
Docosatetraenylethanolamide (DEA)
Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten (Diazylpyrazole) –141716°

SR141716A
SR144528
AM251
AM281
Andere chemische Substanzen mit antagonistischer Wirkung an CB-Rezeptoren
LY320135
6-Iodpravodolin (AM 630)
Indirekte Antagonisten I (AMT-Hemmer)
AM404
OMDM-1 and OMDM-2
AM1172
Arvanil
Olvanil
Linvanil
VDM11-13
Indirekte Antagonisten (FAAH Hemmer)
PMFS (Phenylmethysulphonylfluorid)
URB 532
URB 597
BMS 1

5.7.3 Die Cannabinoidrezeptoren

Primär führte die Suche nach G-Protein-gekoppelten Rezeptoren als Angriffspunkte neuer Pharmazeutika zur Entdeckung der Cannabinoidrezeptoren. Erst nach einer ausführlichen Selektierung einer zerebralen mRNA der Ratte konnte diese als CB₁-Rezeptor Transkript erkannt werden (146). Danach wurden die Rezeptoren des Menschen als auch der Maus geklont (29;83;84). Ohne zuvor einen sicheren Hinweis auf einen weiteren Cannabinoid-Rezeptor zu haben, wurde der CB₂-Rezeptor 1993 entdeckt (155). Die Strukturähnlichkeit der beiden ist geringer als sonst innerhalb einer Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren und beträgt zwischen den Transmembrananteilen eins und sieben nur 48%. Beide Rezeptoren gehören zur Rhodopsin Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diesen gemeinsam sind sieben helikale hydrophobe Anteile, die die Plasmamembran durchdringen und jeweils drei intra- und extrazelluläre Schleifen bilden. Durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es zu einer Konformitätsänderung mit Abspaltung eines aktiven G-Proteins, das zur Aktivierung von Enzymen oder anderen

Ionenkanälen führt (96). Beide Cannabinoidrezeptoren zeigen eine unterschiedliche Verteilung innerhalb der verschiedenen Spezies.

CB₁-Rezeptoren gehören zu den zahlreichsten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren innerhalb des ZNS. Ihre Verteilung wurde von Herkenham *et al* (93) mit radioaktiv markierten Liganden im Rattenhirn erforscht. Es zeigte sich eine heterogene Verteilung mit den höchsten Dichten in den Basalganglien, der Pars reticulata der Substantia nigra und dem inneren und äußeren Kern des Globus pallidus. Zusätzlich wurde auch ein Nachweis im Hippocampus, teilweise im Gyrus dentatus wie auch im Kleinhirn erbracht. Im Gegensatz dazu finden sich sehr wenige Rezeptoren im Bereich des Stammhirns, was gut mit dem Fehlen von Toxizität bei hohen Dosen von Cannabinoiden einhergeht. Eine ähnliche Verteilung fand sich auch im menschlichen Hirn, allerdings zeigte sich eine zusätzliche Verteilung im Kortex aufgrund der stärkeren Ausprägtheit dieses Gehirnabschnittes. Diese zeigte sich besonders im Bereich des limbischen Kortex, mit sehr viel geringeren Mengen im primär sensorisch wie auch motorischen Bereichen (13;87). Aktuelle immunhistochemische Studien konnten diese Befunde bestätigen (69). Besonders in Verbindung mit elektronenmikroskopischen und –physiologischen Untersuchungen konnte dabei gezeigt werden, dass die CB₁-Rezeptoren präsynaptisch auf GABA-haltigen Interneuronen lokalisiert sind (116;117). In Übereinstimmung mit den analgetischen Eigenschaften konnten diese auch auf den sensiblen Bahnen des Rückenmarks und des Cortex nachgewiesen werden (161).

Außerhalb des ZNS fand man den CB₁-Rezeptor beim Menschen im Hoden (84), auf Spermazellen (178), auf Endothelzellen (190), im menschlichen Ileum (49), präsynaptisch auf sympathischen Nervenendigungen (105), sowie in der Harnblase und im Vas deferens.

Die mRNA der CB₂-Rezeptoren wurde hauptsächlich in Zellen bzw. Organen gefunden, die in der Regulierung des Immunsystems beteiligt sind (101). Auf organischer Ebene war dies vor allem im Thymus, der Milz und den Tonsillen, auf zellulärer Ebene hauptsächlich B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Mastzellen. Dabei scheint die Bindung am CB₂-Rezeptor eine immunsuppressive Wirkung zu entfalten (22). Auch wenn durch die Interaktion an diesem Rezeptor hauptsächlich eine Immunmodulation stattfindet, so scheint auch hierdurch der gastrointestinale Transit modifiziert zu werden. Kürzlich konnte in LPS behandelten

Ratten gezeigt werden, dass der beschleunigte Dünndarmtransit durch Agonisten am CB₂-Rezeptor normalisiert werden konnte (145).

Neben diesen Rezeptoren scheint Anandamid zusätzlich auch am intrazellulären Vanilloid-Rezeptor TRPV-1 (transient receptor potential channel vanilloid receptor) zu wirken (213). Bei dem Vanilloidrezeptor TRPV-1 handelt es sich um einen unspezifischen Kationenkanal der hauptsächlich auf primär afferenten Nervenfasern nachzuweisen ist. Er wird durch Capsaicin und Resiniferatoxin aktiviert und kann durch Capsazepine blockiert werden. Er scheint vor allem intrazellulär zu liegen. Das Verhalten von Anandamid an diesem Rezeptor ist wohl von verschiedenen Umständen abhängig. In Geweben mit einer hohen Rezeptordichte und während bestimmter Krankheitsphasen scheint Anandamid als reiner Agonist zu wirken, ansonsten als partieller Agonist. Darüber hinaus führt Anandamid über einen bisher ungeklärten Mechanismus zu einer Aktivitätsänderung des Rezeptors. Verschiedene Mechanismen weisen auf einen Einfluss des TRPV-1 im Magen-Darm-Trakt hin.

Das Toxin von *Clostridium difficile* führt zu einer Aktivierung der Vanilloid-Rezeptoren, zusätzlich aber auch zu einer verstärkten Freisetzung von Anandamid, was auf eine Bedeutung des Endocannabinoidsystems in der Pathologie der pseudomembranösen Kolitis hinweist. Bei Imitation einer gramnegativen Sepsis in Ratten durch die Gabe von LPS (Lipopolysaccharid) wurde die durch Noradrenalin ausgelöste Kontraktion der Mesenterialarterien durch Capsazepine und FAAH gehemmt. Dies deutet auf einen durch Vanilloidrezeptoren vermittelten Mechanismus hin (173).

5.7.4 Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten

Cannabis und Cannabinoide entfalten im Körper des Menschen zahlreiche Wirkungen, sodass einige Wissenschaftler bereits von dem „Aspirin des 21. Jahrhunderts“ sprechen. Vor allem die unterschiedliche und zahlreiche Verbreitung der Cannabinoidrezeptoren im Körper und die spezifische Wirkung über andere Rezeptoren wie dem Vanilloidrezeptor erklären die mannigfaltigen Wirkungen der Cannabinoide und daraus abgeleitet die therapeutischen Möglichkeiten. Im folgenden soll ein Überblick über eine Auswahl der therapeutischen Möglichkeiten gegeben werden:

Analgetische und spasmolytische Wirkung:

Cannabinoide hemmen Schmerzen in nahezu allen experimentellen Ansätzen entweder über CB₁- oder CB₂-ähnlichen Mechanismus supraspinal, spinal oder in peripheren Regionen, abhängig von der Region und den Schmerzbahnen die untersucht wurden (99;201). Diese Ergebnisse sind vereinbar mit der Verteilung von hohen Konzentrationen von CB₁-Rezeptoren auf primär afferenten Neuronen und dem Rückenmark. Wohingegen CB₂-ähnliche Rezeptoren mit der Modulation von „entzündlichen“ Schmerzen in Verbindung gesetzt werden (24;101). *Cannabis* führt wohl auch zu einer Erleichterung von schmerzhaften Krämpfen und Spastik. Dieser Effekt ist jedoch schwer zu objektivieren. In einer experimentellen Studie der Multiplen Sklerose zeigten sich Hinweise auf eine tonische Kontrolle der Spastik und des Tremors durch Cannabinoide (7;8). Dieser Effekt scheint CB₁-vermittelt zu sein. Obwohl CB₁-Agonismus Spastik verhindern konnte, war die entscheidende Beobachtung, dass CB₁-Rezeptor-Antagonisten eine Spastik vorübergehend verschlechtern, was auf ein tonisch aktives Endocannabinod-System hinweist. In der Tat konnte die Hemmung des Abbaus von endogenen Cannabinoiden durch FAAH Inhibitoren zu einem deutlichen antispastischen Effekt, verglichen mit starken CB₁-Agonisten, führen.

In wenigen älteren klinischen Studien konnte die analgetische Wirkung von Cannabis gezeigt werden. In zwei doppelblinden placebo-kontrollierten Studien führte 15 und 20 mg THC im Vergleich zu Placebo bis zu sechs Stunden nach der oralen Gabe in Patienten mit Tumorschmerzen zur Schmerzfreiheit (157;158). Auch in einer Studie mit postoperativen Schmerzen führte intramuskulär verabreichtes Levonantradol intramuskulär zu einer signifikanten Besserung der Schmerzen (111). In einer Übersicht von Dunn&Davis, zeigte sich dass vier Patienten mit Phantomschmerzen einer Milderung Ihrer Schmerzsymptomatik zeigten (68).

Asthma bronchiale:

Die Verabreichung von Cannabis und THC führt definitiv zu einem bronchodilatatorischen Effekt der Bronchiolen der Lunge. In einer Studie mit 14 freiwilligen Asthmatikern konnte der bronchodilatierende Effekt von gerauchtem (medizinisch nur experimentell vertretbar) Cannabis (THC 2%), 15 mg oral verabreichten THC und Isoprenalin 0.5% gezeigt werden. Es zeigte sich, dass sowohl gerauchtes als auch oral verabreichtes THC einen signifikante

Bronchodilatation hervorriefen, die etwa zwei Stunden anhielt. Jedoch ist aufgrund der nachteiligen Wirkungen anderer Rauchbestandteile auf das Asthma gerauchtes THC bisher keine therapeutische Option (100;192).

Glaukom:

Zahlreiche Studien haben die Verminderung des intraokularen Druckes durch gerauchtes, oral und intravenös verabreichten THC gezeigt. Es wurden jedoch nur zwei doppel-blinde kontrollierte Studien in Patienten mit Glaukom durchgeführt. In 18 Patienten konnte zwei prozentiges THC den intraokularen Druck deutlich senken. Doch die beobachteten Nebenwirkungen wie Hypotension und psychotrope Effekte schränken die Anwendungsmöglichkeiten deutlich ein (154).

Weitere Aussichten

Obwohl die bisherigen klinischen Anwendungsmöglichkeiten von Cannabinoiden mehr auf das Management von Symptomen ausgerichtet sind, scheint das Endocannabinoid System verschiedene Möglichkeiten der Therapie neurologischer Erkrankungen zu bieten, insbesondere die verzögerte Progression von neurodegenerativen Erkrankungen. Der selektive Untergang von CB₁-Rezeptoren im Striatum ist assoziiert mit dem Beginn von Chorea Huntington, dabei scheint der Untergang von Cannabinoid regulierten Mechanismen noch vor einem signifikanten Ausbruch der Erkrankung stattzufinden (125). Die Aktivierung von verbleibenden Rezeptoren kann die Symptome einer experimentell erzeugten Chorea Huntington Erkrankung vermindern. Neurodegeneration ist die Ursache vieler Erkrankungen wie z.B. Chorea Huntington, Multiple Sklerose und dem Apoplex. Neurodegenerative Prozesse könnten die Ursache für die Progression von Multipler Sklerose neben entzündlichen Prozessen sein.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Dopamin 2 (D2) Rezeptor Antagonisten zu einer Heraufregulierung von CB₁-Rezeptor-mRNA im Striatum und einer erhöhten Konzentration von Anandamid führen (138). Dies deutet auf ein Einfluss des Endocannabinoidsystems auf das dopaminerge System hin. Eine Überaktivität des dopaminergen Systems wird bei der Schizophrenie vermutet. Und in der Tat konnten in Patienten in der akuten Phase einer Schizophrenie erhöhte Anandamid Werte im Blut nachgewiesen werden (54). Auch der Phänotyp der CB₁-

Knockout-Maus zeigt Veränderungen, die den Symptomen der Schizophrenie ähneln (77).

Dies stellt nur eine kleine Auswahl von therapeutischen Möglichkeiten von Cannabis und Cannabinoiden außerhalb des Gastrointestinaltraktes dar. Das therapeutische Potential auf Motilitätsstörungen soll im wesentlichen in der Speziellen Diskussion aufgeführt werden. Eingeschränkt wird die therapeutische Nutzung der Cannabinoide jedoch durch die unerwünschten Wirkungen die im folgenden Kapitel näher erläutert werden.

5.7.5 Unerwünschte Wirkung von Cannabinoiden

Die akute Toxizität von Cannabinoiden ist sehr gering und bisher wurden keine Todesfälle sowohl in therapeutischer als auch alleiniger missbräuchlicher Anwendung beschrieben. Hingegen zeigen sich einige unerwünschte Nebenwirkungen, die sich bei missbräuchlicher Applikation regelmäßig, bei der therapeutischen Applikation deutlich seltener zeigen:

Sedierung:

Schläfrigkeit, Schwindel, Lethargie 50-100%

Psychiatrische Wirkungen:

Euphorie, Dysphorie, Ängstlichkeit, Kontrollverlust, Gedächtnisstörungen, Paranoia, Todesangst, Halluzinationen, Depression, veränderte Zeitwahrnehmung, Abhängigkeit

Physikalische Symptome:

Xerostomie, Ataxie, Verschwommensehen, Inkoordination, Muskelschwäche, Tremor, Aphasie, Herzstolpern, Herzrasen, Hypotension

Psychomotorische und kognitive Wirkungen:

Verminderte Reaktionszeit, Aufmerksamkeitsstörungen, damit in Verbindung mit der sedierenden Wirkung die Einschränkung der Teilnahme am Straßenverkehr und Bedienung von Maschinen (122)

Auch wenn die bisherigen klinischen Anwendungsmöglichkeiten durch die beschriebenen unerwünschten Wirkungen eingeschränkt zu sein scheinen und somit aktuell bisherige Standardmedikamente der beschriebenen Indikationen überlegen sind, könnte in Zukunft durch die Herstellung neuer Cannabinoide bzw. Cannabinoid-Abkömmlinge brauchbare Medikamente entwickelt werden. So wurde vor kurzem die Entwicklung von einer analgetischen Substanz – Ajulemic Säure – berichtet, die von einem Hauptmetaboliten des THC abgeleitet wurde. Diese scheint frei von psychotropen Wirkungen zu sein und auch keine Abhängigkeitssymptomatik zu zeigen. Sie war im Vergleich zu Placebo in präklinischen Studien analgetisch wirksam (21).

Ein weiterer Ansatz könnte die Nutzung von indirekten Antagonisten der Cannabinoide sein, wie z.B. FAAH Inhibitoren. FAAH-Knockout Mäuse zeigen ein normales Körpergewicht, normale Verhaltensweisen und Körpertemperaturen. Jedoch konnten in verschiedenen Gehirnabschnitten dieser Mäuse eine 10-15-fach erhöhte Konzentration von Anandamid nachgewiesen werden bei einer verminderten Schmerzwahrnehmung (47).

5.7.6 CB1-Knockout-Maus

Unabhängig voneinander konnten zwei Labore CB₁-Knockout-Mäuse generieren. Durch Gentergeting und homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen konnten Mäuse gezüchtet werden, die keine CB-Rezeptoren bildeten. Diese zeichneten sich durch einen Phänotyp aus, der geprägt war durch Hyperaktivität, spinaler Hypoalgesie und erhöhter Mortalität (212). In Untersuchungen zur Erfassung der Gedächtnisleistung zeigte sich ein deutlicher Vorteil zugunsten der Knock-out Mäuse. Dies weist darauf hin, dass CB-Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der Verarbeitung kognitiver Funktion spielen (141;170). Die klassischen Wirkungen und Nebenwirkungen von exogen zugeführten Cannabinoiden, die durch Bindung an den CB₁-Rezeptor ausgelöst werden, war bei diesen Mäusen nicht mehr nachweisbar. Jedoch konnten andere Wirkungen gezeigt werden und nicht über die „klassischen“ Cannabinoidrezeptoren ausgelöst werden. So wurden exzitatorische postsynaptische Potentiale sowohl in Wildtyp-Mäusen als auch in den Mutanten durch WIN55,212-2, einem selektiven CB-Agonisten, verändert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass es weitere Rezeptoren gibt, die spezifisch für Cannabinoide sind.

Neben primär unerwünschten Eigenschaften, wie einer erhöhten, Mortalität zeigten weitere Untersuchungen an diesen Tieren auch verschiedene therapeutische Ansatzmöglichkeiten auf. Gegenüber verschiedenen suchterzeugenden Mitteln zeigten diese transgenen Mäuse eine verminderte Entwicklung einer Abhängigkeit, dies zeigte sich jedoch nicht für Morphin (38;71;127). In Zukunft könnten somit CB-Antagonisten zur Therapie bei Drogenabhängigkeit eingesetzt werden. Diese Effekte konnten durch Studien reproduziert werden, in denen CB₁-Rezeptor-Antagonisten appliziert wurden (186).

6 SPEZIELLE DISKUSSION

Die Rationale dieser Doktorarbeit entstand aus der Vorstellung, dass verschiedene Untersuchungen den Einfluss von Cannabinoiden auf die Motilität des Magen-Darm-Traktes untersucht haben. Bisher gab es jedoch keine Untersuchungen zum Einfluss von Anandamid und dessen Antagonisten AM251 auf den myenterischen Reflex. Geplant war zunächst ein drei-gekammertes System zur Unterscheidung der neuronalen Wirkorte (Sensorik/Überleitung/Motorik). Der myenterische Reflex, wie bereits zuvor beschrieben, konnte jedoch in diesem Drei-Kammer-Bad nicht vollständig dargestellt werden. Die deszendierende Kontraktion und Relaxation war nicht stabil ableitbar, sodass diese nicht in die Auswertung eingehen konnten. Es ist anzunehmen, dass durch die Separation des Organbades insbesondere die sensible deszendierende Neurotransmission des myenterischen Reflex gestört wurde. Es wurde für diese Studie ein neuartiges zwei-gekammertes System entwickelt, das eine Unterscheidung in Stimulationskammer (Interneurone) und Wirkort (finales Motoneuron) ermöglicht. Die Auswahl der Ratte und Maus erfolgte aus der Überlegung heraus, dass im Ileum dieser Tiere neben dem Meerschweinchen, Schwein und Menschen der Nachweis von CB₁-Rezeptoren erbracht werden konnte (27;109;162;165;188). Somit erscheint die Nutzung dieser Tiere im Rahmen dieser Doktorarbeit durchaus als sinnvoll. Zwei Spezies waren zum einen notwendig, da es bisher nicht gelungen ist, den myenterischen Reflex im Dünndarm der Maus darzustellen. Zum anderen waren zur Bestätigung der *in vitro* Versuche und der Annahme, dass durch Blockade der CB₁-Rezeptoren die Motilität des Dünndarmes moduliert wird, weitere *in vivo* Versuche notwendig, welche an CB₁-Knockout-Mäusen optimal ergänzt werden konnten.

Lokalisierung der CB₁-Rezeptoren

Den ersten Nachweis über Endocannabinoide im Gastrointestinaltrakt erbrachten Mechoulam et al (151), die 2-AG jedoch nicht Anandamid im Dünndarm des Kaninchens nachweisen konnten. Inzwischen wurden hohe Mengen von Anandamid und 2-AG im Dünndarm und Kolon der Maus nachgewiesen (106;166). Wie oben bereits beschrieben, wurde im Dünndarm verschiedener Spezies der Nachweis von CB₁-Rezeptoren erbracht. Dabei konnten im Magen und im Duodenum der Ratte CB₁-Rezeptoren nachgewiesen werden (1;19;45;188). Differenziertere Untersuchung zur Verteilung von CB₁-Rezeptoren wurden im gesamten Verdauungstrakt der Maus

durchgeführt. Mit Ausnahme des Pylorus waren im gesamten Magen-Darm-Trakt CB₁-Rezeptoren nachzuweisen mit der größten Dichte in Magen und Colon (27). Im Dünndarm des Meerschweinchens scheinen CB₁-Rezeptoren präsynaptisch auf myenterischen Neuronen gelegen zu sein, die als finale Motoneurone dienen. So konnten (+)-WIN55,212-2 und CP55940 die Amplitude von Motoneuronen des S-Typs reduzieren, dieser Effekt war durch SR141716A antagonisierbar (130). Auch im embryonalen Verdauungstrakt der Ratte ist CB₁-mRNA im myenterischen und submukösen Plexus enthalten (18). In der adulten Ratte konnten Storr *et al.* CB₁-mRNA im Magen der Ratte nachweisen. Immunhistochemische Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern gegen das N-terminale Ende des CB₁-Rezeptors, bestätigten, dass CB₁-Rezeptoren auf Neuronen des myenterischen Plexus liegen (18). In einer weiteren Studie mit der gleichen Methode waren CB₁-Rezeptoren auf dem myenterischen Plexus von adulten Meerschweinchen und Ratten nachweisbar. Dabei umgaben CB₁-positive Fasern die Zellkörper von Acetyltransferase-haltigen und damit cholinergen Neuronen (4). Elektrisch stimulierte Kontraktionen von Plexuspräparaten des Menschen und des Meerschweinchens, die durch Cannabinoid Rezeptor Agonisten gehemmt werden können, sind sensibel auf TTX, in der Annahme, dass es sich um neuronale Übertragungen, nicht um direkte elektrische Stimulationen der glatten Muskelzelle handelt (49).

Auch die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass die hemmende Wirkung der Cannabinoide im Bereich der motorischen Endplatte stattfindet. Durch die EFS kommt es zu einer Aktivierung von Interneuronen, die durch cholinerge Neurontransmission zur Aktivierung von finalen Motoneuronen führen. Diese führen vermutlich über eine Ausschüttung von Acetylcholin bzw. Tachykininen zur Kontraktion der glatten Muskelzellen. Dies stimmt auch mit funktionellen Studien überein, die eine verminderte Freisetzung von Acetylcholin aus myenterischen Nerven durch Cannabinoide zeigen (120;121;140;143;166). Bei Zugabe von Anandamid und AM251 in die Stimulationskammer kommt es zu keiner Beeinflussung der aufsteigenden Kontraktion, wohingegen eine Zugabe in die Ableitungskammer zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung durch Anandamid und konzentrationsabhängigen Steigerung durch AM251 führt. Somit ist davon auszugehen, dass die Interaktion im Bereich zwischen finale Motoneuron und glatter Muskelzelle und nicht im Bereich der Interneurone stattfindet.

CB₁-Agonismus

Izzo *et al.* (106) konnten zeigen, dass WIN55,212-2 und CP 55940 die Peristaltik von isolierten Dünndarmsegmenten des Meerschweinchens, ausgelöst durch intraluminale Perfusion, hemmen konnten. Dieser Effekt war durch SR 141716A antagonisierbar, vereinbar mit der Hypothese, dass es sich um einen CB₁-selektiven Prozess handelt. Ebenso konnten Heinemann *et al.* (92) nachweisen, dass peristaltische Wellen, ausgelöst durch intraluminale Druckerhöhung, durch Methanandamid konzentrationsabhängig gehemmt werden konnten. Dieser Effekt konnte durch SR141716A, durch L-NAME, einem unspezifischen Blocker von NOS (nitric oxide synthetase), und Apamin, einem Blocker von K-abhängigen Niedervoltage-Ca-Kanälen (small conductance calcium dependent potassium channels) abgeschwächt werden. Des weiteren konnten sie nachweisen, dass die aszendierende Kontraktion des peristaltischen Reflexes der Ringmuskulatur, ausgelöst durch intraluminale Dehnung mittels eines Ballons ebenfalls durch Methanandamid gehemmt werden konnte. Dieser Effekt konnte durch SR141716A teilweise geblockt werden. In einem weiteren Versuch konnten Izzo *et al.* (108) den Nachweis erbringen, dass elektrisch induzierte cholinerge und NANC Kontraktionen einer Ringmuskelpreparation durch WIN 55,212-2 inhibiert werden konnten; wiederum war dieser Effekt SR141716A sensitiv.

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein insgesamt dosisabhängiger hemmender Einfluss auf die aszendierende Kontraktion des peristaltischen Reflexes durch Anandamid.

In *in vivo* Versuchen konnte der hemmende Einfluss von Cannabinoiden auf die Motilität des Magen-Darm-Traktes sowohl der Ratte (106;139;179) als auch der Maus (25;34;61;62;107;110) ebenfalls bestätigt. Wie bereits durch die *in vitro* Daten zu erwarten ist, scheint der hemmende Effekt auf den intestinalen Transit CB₁-vermittelt zu sein. Dieser Effekt ist wohl dosisabhängig für die gängigen CB₁-Rezeptoragonisten Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, Nabilon, Cannabinol, (+)-WIN55,212-2, CP55940 und Anandamid jedoch nicht für das inaktive (-)-Enantiomer von WIN 55,212-2 oder Cannabidiol (34;106;107;110;179). Dieser Effekt war durch SR141716A jedoch nicht durch SR144528 (25;107;110;139) oder Naloxon zu hemmen. Wenn diese Überlegungen richtig sind, sollte es bei dem Transit im Dünndarm der CB₁^{-/-} Maus im Gegensatz zur CB₁^{+/+} zu einem beschleunigten

intestinalen Transit kommen. So konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass CB₁^{-/-} Mäuse einen deutlich beschleunigten Dünndarmtransit zeigen. So ist anzunehmen, dass durch Endocannabinoide, die den CB₁-Rezeptor stimulieren, die Motilität des Dünndarms physiologischerweise gehemmt wird.

CB₁-Antagonismus

Der Einfluss von CB₁-Rezeptor Antagonisten auf die Motilität des Dünndarm wurde bereits in einigen Versuchen nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass der spezifische CB₁-Rezeptor-Antagonist SR141716A sowohl die Amplitude von elektrisch induzierten Kontraktionen von Ileum Plexus myentericus Präparationen als auch cholinergen und NANC Kontraktionen von Ringmuskelpräparaten ausgelöst durch elektrische Feldstimulation verstärkt (44;46;108;164). Es wurde auch berichtet, dass SR141716A elektrisch induzierte Acetylcholinfreisetzung von Ileum Plexus myentericus Präparationen (bei Zugabe von Physostigmin) erhöht (46) und sowohl die durch Distension ausgelöste aszendierende Kontraktion des enterischen Reflexes der Ringmuskelschicht des Dünndarms als auch den maximalen Auswurfdruck in isolierten Dünndarmsegmenten des Meerschweinchen (92) erhöht. Eine Erklärung für die Produktion von diesen inversen „cannabimimetischen Effekten“ ist, dass der Dünndarm Endocannabinoide ausschüttet, die dann von SR141716A geblockt werden. Eine andere Erklärung könnte auch sein, dass SR141716A ein inverser Agonist als nur ein reiner Antagonist oder stiller Agonist ist. Übereinstimmend mit der ersten Hypothese ist die Tatsache, dass sowohl im Dünndarm der Ratte (57;114;198), des Meerschweinchens als auch der Maus FAAH und ein Aufnahmemechanismus für Endocannabinoide vorhanden ist. Diese Effekte konnten durch einen unspezifischen FAAH-Hemmer PMSF (163) (Phenylmethylsulphonylfluoride) als auch AM404 (211) einem Aufnahmehemmer gesteigert werden. Die Applikation des AMT-Inhibitors VDM11 konnte die Motilität des Kolons der Maus reduzieren. Auch im Rahmen dieser Doktorarbeit führte die Applikation von AM251 zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Steigerung der aszendierenden Kontraktion des myenterischen Reflexes. Somit scheint auch im Dünndarm der Ratte durch die Blockierung von CB₁-Rezeptoren und damit von Endocannabinoiden, die Motilität beschleunigt zu werden.

Wirkung auf Interstitielle Zellen nach Cajal

ICC sind für die Generierung von slow waves im Magen-Darm-Trakt verantwortlich. Ob und in wiefern CB₁-Rezeptoren eine Rolle bei der Generierung von slow waves spielen ist bisher nicht geklärt. In den elektrophysiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von 1 µM Nifedipin, die slow wave Aktivität der zirkulären Muskelzelle des Dünndarms der CB₁^{-/-} Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus nicht mehr nachzuweisen ist. In bereits veröffentlichten Studien zeigte sich, dass 3 µM Nifedipin in der gleichen Versuchsanordnung keinen Effekt auf die Generierung von slow waves im Dünndarm der Maus hat (118). Die Auslösung von elektrisch induzierten IJPs ist jedoch auch unter dem Einfluss von Nifedipin nicht verändert, sodass anzunehmen ist, dass eine funktionstüchtige Neurotransmission bei defekter slow wave Rhythmik vorhanden ist. Die Veränderungen in den CB₁^{-/-} Mäusen werden weiter untersucht werden. Dabei wird insbesondere geklärt werden müssen, ob durch ein Fehlen von CB₁-Rezeptoren, ICCs bei der Entwicklung nicht gebildet werden oder ob es zu einer Veränderung der Neurotransmission zwischen ICCs und glatter Muskelzelle durch Veränderung des Ca²⁺-Haushaltes oder der Sensibilitätsmodifikation von L-Typ Ca²⁺-Kanälen kommt.

Hierfür spricht, dass in einigen Studien die Kopplung von CB₁-Rezeptoren mit Ca²⁺ Kanälen nachgewiesen werden konnte, bisher hauptsächlich in Zelllinien aus dem ZNS oder glatten Muskelzellen von Gefäßen (siehe Tab.11). Diese Resultate könnten auch die Effekte von Nifedipin in CB₁^{-/-} Mäusen erklären.

Tabelle 12: Übersicht von Studien, in denen Interaktionen von Cannabinoiden mit Ca²⁺ Kanälen beschrieben wurden.

Zellen	Ca ²⁺ -Kanäle	Effekt	Referenz
Glatte Muskelzelle in Hirnarterien der Katze	L-Typ	Hemmung durch Anandamid und R-(+)-WIN 55212; Aufhebung der Wirkung durch SR141716A	(82)
Neuronale Zellen	N-Typ	Hemmung durch Δ ⁹ -THC and CP-55940	(28;133)
Kleinhirnzellen	Q-Typ	Hemmung durch Anandamide, WIN55,212-2	(134)

Diese Versuche geben Hinweise darauf, dass das Endocannabinoidsystem maßgeblich an der Regulation der Motilität des Magen-Darm-Traktes beteiligt ist. Es bietet sich somit durch den CB₁-Rezeptor ein Mechanismus als therapeutischer Ansatzpunkt an, durch den die Motilität des Dünndarmes und vermutlich auch

weiterer Teile des Magen-Darm-Traktes sowohl stimuliert als auch gehemmt werden kann.

Aus dem Hintergrund dieser Ergebnisse zeigt sich, dass die Cannabinoide abgesehen von den bereits erwähnten Indikationen, eine große Vielfalt therapeutischer Möglichkeiten bieten. Im folgenden sollen einzelne erläutert und diskutiert werden:

Reizdarmsyndrom:

Das Reizdarmsyndrom stellt eine der häufigsten Diagnosen in der Gastroenterologie dar. Es ist charakterisiert durch abnorme intestinale Motilität mit erhöhter Kontraktilität und beschleunigtem bzw. verlangsamten Transit. In der Klinik wird der diarrhöische vom obstipierenden Typ unterschieden. Diese Erkrankung kann zusätzlich durch abdominelle Schmerzen, Völlegefühl und Blähungen begleitet sein. Bisher stellte diese Diagnose eine Ausschlussdiagnose bei fehlendem morphologischem Korrelat zu den genannten Symptomen dar. Es wird aber auch diskutiert, dass strukturelle und molekulare Veränderungen, aber auch psychische Faktoren vorliegen können, die zu einem Reizdarmsyndrom führen. Die Therapie besteht je nach Symptomatik aus einer Kombination aus Medikamenten, die die Motilität des Magen-Darm-Traktes verändern, Analgetika bzw. Antidepressiva. Zur Zeit werden Anticholinergika zur Therapie genutzt und Medikamente, die den intestinalen Transit verlangsamen, wie z.B. Loperamid. Seit kurzem stehen auch Serotonin-Rezeptorantagonisten wie Tegaserod bzw. Alosetron, die je nach Rezeptor zu einer Stimulierung bzw. Hemmung der Motilität führen (26).

Durch die Wirkung am CB₁-Rezeptor lässt sich die Motilität des Magen-Darm-Traktes ebenfalls modulieren. So führt wie bereits erwähnt der Agonismus zu einer Hemmung, der Antagonismus zu einer Beschleunigung des intestinalen Transits. Darüber hinaus entfalten Cannabinoide analgetische Wirkungen im Körper. Somit erscheinen Cannabinoide und ihre Antagonisten als nützliche Substanzen zur Behandlung von Patienten mit Reizdarmsyndrom. Dies muss jedoch in klinischen Studien weiter untersucht werden.

Morbus Crohn:

Morbus Crohn ist durch eine chronisch-entzündliche granulomatöse Entzündung des gesamten Magen-Darm-Traktes gekennzeichnet, die zur Ausbildung von

Ulzerationen, Fisteln, Blutungen und Narbenbildungen führen kann. Dies kann bei Patienten zu Krämpfen, Spasmen, Übelkeit und Erbrechen, Gewichtsverlust starker Diarrhoe und rektaler Blutung führen. Die bisherige Therapie besteht in der antiinflammatorischen Therapie mit Steroiden und in besonders schweren Fällen mit Immunsuppressiva. Begleitende chronische Diarrhöen werden durch nicht spezifische Antidiarrhoika, wie z.B. Loperamid behandelt. Obwohl keine klinischen Studien zu Cannabis Wirkungen in Bezug auf Morbus Crohn existieren, so weisen doch Erfahrungen von Cannabis konsumierenden Patienten darauf hin, dass die Symptome durch diese gemildert werden (89). Dies ist nicht verwunderlich, da bekannt ist, dass Cannabis zur Reduktion solcher Symptome führen kann, wie im folgenden zusammengefasst wird.

Ein experimentell durch Kroton-Öl (dem Öl der Pflanze *Croton tiglium*, das durch seine toxische Wirkung zur Auslösung von Diarrhöe führt) beschleunigter intestinaler Transit konnte durch geringere Mengen eines CB₁-Agonisten gehemmt werden (106). In einer kürzlich veröffentlichten Studie schützte die Stimulierung von CB₁-Rezeptoren vor einer durch DNBS verursachten Colitis (144). Zusätzlich weisen Cannabinoide eine analgetische Wirkung in nahezu allen experimentellen Studien auf (99;201). Diese Kombination aus analgetischer, antiinflammatorischer und motilitätshemmender Wirkung von Cannabinoiden erscheint damit ideal zur Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Dies muss jedoch in weiteren klinischen Studien geklärt werden. Auch die Bedeutung des CB₂-Rezeptors in der Pathophysiologie und Therapie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist noch unklar.

Paralytischer Ileus

Der paralytische Ileus ist definiert als eine Hemmung der gastrointestinalen Motilität reflektorisch auf einen Reiz im Magen-Darm-Trakt. Viele Situationen können einen paralytischen Ileus verursachen, so z.B. eine Peritonitis, Trauma, Rückenmarksverletzung, Pneumonie, Pankreatitis und Herzinfarkt. Es kommt dabei zu Meteorismus, Blähung, Übelkeit und Schmerzen. Agonismus am CB₁-Rezeptor führt zu einer Steigerung der Motilität des Magen-Darm-Traktes. Ein experimentell induzierter Ileus der Maus konnte durch SR141716A behandelt werden, wohingegen VDM11, ein Wiederaufnahmehemmer für endogene Cannabinoide, die Symptome verschlechterte. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe war dabei der Gehalt von

Anandamid, die Menge und Dichte der CB₁-Rezeptoren erhöht (143). Diese Befunde zeigen nicht nur die ursächliche pathophysiologische Beteiligung von endogenen Cannabinoiden an der Entstehung des paralytischen Ileus auf, sondern bieten zudem die Möglichkeit einer therapeutischen Beeinflussung.

Appetit

Zahlreiche bewusste und unbewusste physiologische Mechanismen regulieren die Nahrungsaufnahme. Mehrere Hormone (wie Leptin und Adiponectin), Peptide (wie Peptid YY, Glukagon-like Hormon 1, Orexin Proopiomelanocortin, CART (cocaine and amphetamine regulating transcript) und Neuropeptid Y) und Neurotransmitter (wie Serotonin und Dopamin) regulieren oder modulieren die Nahrungsaufnahme sowohl in Ratten wie auch im Menschen. Experimentelle und klinische Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Endocannabinoidsystem an der Regulierung des Appetits maßgeblich beteiligt ist.

Bereits in den 70er Jahren wurde von jungen Patienten, die an Krebs erkrankt waren, berichtet, das gerauchte Marihuana Chemotherapeutika-induziertes Erbrechen und Übelkeit vermindern würde (167). Seither wurde die antiemetische Wirkung von Cannabis und Cannabisprodukten sowohl durch staatlich als auch industriell gesponserte Studien untersucht. In einigen Ländern sind Nabilon, ein durch Eli Lilly entwickeltes synthetisches Cannabinoid sowie Dronabinol (Δ^9 -THC) als Antiemetika bei Chemotherapeutika-induziertem Erbrechen zugelassen. Darüber hinaus scheint Nabilon effektiv bei Anästhetika induzierter PONV (post operativ nausea and vomiting) zu sein (167). In einer Übersicht aus 30 klinischen randomisierten Studien zeigte sich eine leichte Überlegenheit von Cannabinoiden gegenüber konventionellen Antiemetika (Prochlorperazin oder Metoclopramid) zur Behandlung Chemotherapeutika-induzierter Übelkeit. Diese wurden von den Patienten trotz der herkömmlichen Nebenwirkungen wie Dysphorie bzw. Euphorie bevorzugt (196). Trotz dieser geringen Überlegenheit gegenüber den gängigen D₂-Rezeptor Antagonisten scheint die antiemetische Wirkung von Cannabinoiden nicht die von 5-HT₃-Antagonisten in der akuten Phase Chemotherapeutika-induzierter Übelkeit zu übertreffen (88). Bei der chronischen Übelkeit zeigen die Cannabinoide einen Vorteil gegenüber 5-HT₃-Antagonisten (53). Abgesehen von diesen klinischen gibt es nur wenige experimentelle Studien, die die antiemetische Wirkung untersucht haben. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Δ^9 -THC, WIN55,212-2 und Methanandamid Morphin-induzierte Übelkeit in Frettchen vermindern konnten,

AM251 hingegen potenzierte diese (199). In einer anderen Studien zeigte sich, dass SR141716A allein appliziert Übelkeit in Spitzmäusen induzierte (53). Man nimmt daher an, dass Cannabinoide Übelkeit zentral im Bereich der Area postrema beeinflussen. Durch Änderung der Molekülstruktur ließen sich somit Medikamente entwickeln, die nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden und somit nicht zu den psychischen Nebenwirkungen führen.

Neben diesen pathologischen Zuständen verminderter Nahrungsaufnahme führt eine Stimulation des Endocannabinoidsystems auch unter physiologischen Zuständen zu einer Förderung der Nahrungsaufnahme. So führte die periphere Administration von Anandamid und 2-AG zu einer appetitsteigernden Wirkung in übersättigten Ratten (206). Direkte ventromediale Injektion von Anandamid in den Hypothalamus stimulierte die Nahrungsaufnahme. Die Konzentration von 2-AG im Vorderhirn und Hypothalamus scheint positiv mit der Nahrungsaufnahme korreliert zu sein (112).

Im Gegensatz dazu führt eine Hemmung des CB₁-Rezeptors zu einer Reduktion des Appetits. SR141716A führte zu einer Hemmung des Appetits in einer Reihe von Kurzzeitstudien in Ratten (5), Mäusen (64), Affen (181) und Menschen (126;168). In Langzeitstudien mit SR141716A und AM251 in Ratten (33) und Mäusen (94;169) zeigte sich eine appetithemmende Wirkung und eine langanhaltende Reduktion des Körpergewichts, ohne dass es zu einer Toleranzentwicklung kam. In CB₁-Knockout-Mäusen zeigt sich ein vermindertes Hungergefühl nach Futterentzug. Auch bei nächtlichem Nahrungsentzug fehlte ein vermehrtes Nahrungsverlangen (64). SR141716A zeigte keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme in CB₁-Knockout Mäusen, somit scheint es sich um einen CB₁-vermittelten Mechanismus zu handeln. Diese Versuche zeigen, dass CB₁-Rezeptor Antagonisten durch die Wirkung am CB₁-Rezeptor zentral an der Verarbeitung und Nahrungsaufnahme beteiligt sind (91). Dabei scheint die Nahrungsaufnahme direkt mit molekularen Veränderungen des Endocannabinoidsystems im ZNS verbunden zu sein. Die Fütterung von Ratten führt zu einer Verminderung der CB₁-Rezeptor-Dichte im Nucleus accumbens und Hippocampus – Hirnregionen die mit der Verarbeitung von hedonistischen Aspekten der Nahrungsaufnahme verbunden sind. Eine Downregulierung findet meist bei einer intrinsischen oder externen Stimulation statt, sodass vermutlich die Nahrungsaufnahme zu einer Ausschüttung von Endocannabinoiden führt. Darüber hinaus wird der CB₁-Rezeptor in Regionen des Hypothalamus exprimiert, die an der Regulierung der Nahrungsaufnahme beteiligt sind. Abgesehen von diesen wohl

zentral vermittelten Mechanismen scheinen auch lokale Faktoren die anorektische Wirkung von Cannabinoiden zu unterstützen. So zeigen isolierte primäre Adipozyten eine gesteigerte Expressierung von CB₁-Rezeptoren, die auf CB₁-Rezeptor-Agonisten reagieren (43).

Parallel zu diesen experimentellen Studien sind bereits erste klinische Studien durchgeführt worden. Hier zeigte sich in einer Phase II Studie über 16 Wochen eine signifikante Gewichtsabnahme bei täglichen Dosen von 5, 10 und 20 mg SR 141716A (Rimonabant). Aktuell wird eine Phase III Studie zur Therapie der Adipositas durchgeführt (15).

Dabei scheint SR141716A relativ arm an Nebenwirkungen zu sein. In Dosen zwischen 5 und 20 mg zeigte Rimonabant in adipösen Patienten keine Nebenwirkungen. In 83 gesunden Marihuana Konsumenten zur Untersuchung als Antidot bei Marihuana-Intoxikationen mit Einzeldosen bis 90 mg konnten ebenfalls keine Nebenwirkungen beobachtet werden (104).

7 ZUSAMMENFASSUNG

In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch die Modulation am CB₁-Rezeptor am Dünndarm von Ratte und Maus die Motilität des Magen-Darm-Traktes *in vitro* beeinflusst werden kann. Dabei führt Anandamid, das aktuell am intensivsten erforschte Endocannabinoid, zu einer signifikanten Hemmung der aszendierenden Kontraktion des peristaltischen Reflexes. AM251 wiederum, ein selektiver Antagonist am CB₁-Rezeptor, führt zu einer deutlichen Zunahme der aszendierenden Kontraktion. Diese Effekte waren jedoch nur nachweisbar bei Applikation in die Ableitungskammer, sodass anzunehmen ist, dass die Modulation durch den CB₁-Rezeptor im Bereich der motorischen Endplatte und glatter Muskelzelle bzw. ICC und Muskelzelle stattfindet.

Der peristaltische Reflex führt durch eine analwärts gerichtete Propulsion zu einem Transport von Darminhalt. Aus einer Steigerung der aszendierenden Kontraktion ist somit zu folgern, dass der intestinale Transit beschleunigt wird. Dabei scheint durch einen Agonismus am CB₁-Rezeptor der Transit verlangsamt, durch einen Antagonismus der Transit beschleunigt zu werden. Da die alleinige Applikation des Antagonisten AM251 zu einer Beschleunigung führt, ist anzunehmen, dass ein tonisch aktives Endocannabinoidsystem besteht, das durch Ausschüttung von CB₁-agonistischen Endocannabinoiden zu einer physiologischen Hemmung der Darmmotilität führt.

Zur Bestätigung dieser Überlegungen wurden Transitversuche in CB₁^{-/-} Mäusen durchgeführt, in denen bei Zutreffen dieser Hypothese ein beschleunigter Transit stattfinden sollte. Und in der Tat konnte gezeigt werden, dass ein bis zu 33% beschleunigter Transit vorhanden ist.

Somit bieten sowohl agonistische als auch antagonistische Liganden am CB₁-Rezeptor Möglichkeiten zur Behandlung von Motilitätsstörungen. Agonisten könnten dabei als Antidiarrhoika, Antagonisten als Prokinetika eingesetzt werden. Als Einsatzmöglichkeiten bieten sich dabei Erkrankungen mit beschleunigtem intestinalen Transit, wie Diarrhöe, IBS und CED oder im Gegensatz dazu bei verlangsamtem intestinalen Transit IBS vom obstipationsbetonten Typ, Obstipation und der paralytische Ileus an. Zur weiteren Erforschung dieser therapeutischen Ansätze, die bisher nur im Rahmen von experimentellen Studien untersucht wurden,

sind sicherlich klinisch kontrollierte Studien notwendig. Natürliche Cannabinoide wie Δ^9 -THC scheinen als Agonisten aufgrund des Fehlens von akuter Toxizität der natürlichen Cannabinoide und somit einer großen therapeutischen Breite diese Stoffe grundsätzlich geeignet, jedoch aufgrund der unerwünschten Wirkungen nicht optimal zu sein. Günstiger erscheinen „indirekte“ Agonisten, wie FAAH-Hemmer und AMT-Hemmer, die zu einem verzögerten Metabolismus und einer verlängerten Wirkung von Endocannabinoiden führen. Das Spektrum an unerwünschten Nebenwirkungen muss jedoch im Rahmen von weiteren experimentellen und klinischen Studien erforscht werden. Im Gegensatz zu den Agonisten liegt mit SR141716A (Rimonabant) bereits ein Antagonist vor, der in einer Phase III Studie zur Behandlung von Adipositas untersucht wird. Im Rahmen von weiteren Studien sollten Antagonisten und Agonisten am CB₁-Rezeptor auf ihre Anwendbarkeit im Bereich der Motilität untersucht werden um zukünftig das therapeutische Spektrum der motilitätswirksamen Pharmaka zu bereichern.

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Etwa 10 cm lange Dünndarmsegmente der Ratte wurden in das doppelwandige Organbad eingespannt und an beiden Enden mittels Fäden fixiert. Nach der Stimulation über die Platinelektrode (40V, 3Hz, 1ms) konnten über den Kraftwandler die aszendierenden Kontraktionen des peristaltischen Reflexes abgeleitet werden.....	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der in die Auswertung eingehenden Größen: Höhe, Fläche (AUC=Area under the curve) und Latenz (EFS=elektrische Feldstimulation).....	11
Abbildung 3: Die Streifen der zirkulären muskulären Schicht mit erhaltenem Plexus myentericus wurden mit dünnen Wolfram Drähten (15, 25 μm Diameter) auf dem mit Sylgard ausgegossenen Boden der elektrophysiologischen Kammer so fixiert, dass die ZM oben zum Liegen kommt. Die Kammer wurde mit vorgewärmten und Carbogen-begastem KRP (pH7,4, T=37°C) perfundiert. Kapillarglasmikroelektroden wurden gezogen, mit KCL (3 M) angefüllt (Resistenz 100-150 M Ω). Die zelluläre Antwort wurde durch eine im Organbad platzierte Ag-AgCl "Erdungs" Elektrode registriert und danach mit einem Verstärker verstärkt. Das analoge Ausgangssignal des Verstärkers wurde in eine digitale Form umgewandelt und auf dem PC mittels der Software LABVIEW Version 5.0 gespeichert.....	15
Abbildung 4: Bei der Datenauswertung wurde die Amplitude und Frequenz der slow waves als auch der IJPs abgelesen	16
Abbildung 5: Dargestellt sind repräsentative Aufzeichnungen der aszendierenden Reflexantworten unter dem Einfluss von kumulativ steigenden Konzentrationen von Anandamid	19
Abbildung 6: Darstellung des Einflusses von Anandamid in kumulativ steigenden Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-5} M) auf den aszendierenden exzitatorischen Reflex bei Applikation in die Stimulationskammer (n=5). Es zeigt sich eine leichte Zunahme der Fläche der Kontraktionen, jedoch ist diese nicht statistisch signifikant	20
Abbildung 7: Dargestellt ist der Einfluss von Anandamid auf die Latenz der aszendierenden Kontraktion zwei cm oberhalb des Stimulationsortes. Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss.....	21
Abbildung 8: Dargestellt sind repräsentative Aufzeichnungen der aszendierenden Reflexantworten unter dem Einfluss von kumulativ steigenden Konzentrationen von AM251	23
Abbildung 9: Darstellung des Einflusses von AM251 in kumulativ steigenden Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-5} M) auf den aszendierenden exzitatorischen Reflex bei	

Applikation in die Stimulationskammer (n=4). Es zeigt sich eine leichte Zunahme der Höhe der Kontraktion, jedoch ist diese nicht statistisch signifikant.....	23
Abbildung 10: Zeigt den Einfluss von AM251 auf die Latenz der aufsteigenden Kontraktion zwei cm oberhalb des Stimulationsortes. Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss.	25
Abbildung 11: Dargestellt sind repräsentative Aufzeichnungen der aufsteigenden Reflexantworten unter dem Einfluss von kumulativ steigenden Konzentrationen von Anandamid bei Applikation in die Ableitungskammer	27
Abbildung 12: Einfluss von Anandamid in kumulativ steigenden Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-5} M) auf den aufsteigenden exzitatorischen Reflex bei Applikation in die orale Kammer. Es zeigt sich eine Hemmung der Kontraktionskraft in Höhe und AUC (n=6).....	27
Abbildung 13: Darstellung der Wirkung von Anandamid auf die Latenz der aufsteigenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-5} M) bei Applikation in die Ableitungskammer (n=6) im Abstand von 2cm von der Stimulationselektrode	29
Abbildung 14: Dargestellt sind repräsentative Aufzeichnungen der aufsteigenden Reflexantworten unter dem Einfluss von kumulativ steigenden Konzentrationen von AM251 bei Applikation in die Ableitungskammer	31
Abbildung 15: Einfluss von AM251 in kumulativ steigenden Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-5}) auf die Höhe und AUC der aufsteigenden Kontraktion bei Applikation in die orale Kammer. Es zeigt sich eine starke Zunahme, die nicht durch Anandamid reversibel ist (n=6).	31
Abbildung 16: Darstellung der Wirkung von AM251 auf die Latenz der aufsteigenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-5} M) bei Applikation in die Ableitungskammer (n=6) im Abstand von 2 cm von der Stimulationselektrode.....	33
Abbildung 17: A) Darstellung der spontanen Basalaktivität der glatten zirkulären Dünndarmmuskulatur im Ruhezustand und unter dem Einfluss von 10^{-6} M Nifedipin zwischen Wildtypmaus links und CB ₁ ^{-/-} Maus rechts. B) Darstellung der spontanen Basalaktivität der glatten zirkulären Dünndarmmuskulatur im Ruhezustand und unter dem Einfluss von 10^{-6} M Nifedipin zwischen Wildtypmaus links und CB ₁ ^{-/-} Maus rechts in einem kleineren Maßstab C) Darstellung der Auslösung von IJPs zwischen der glatten zirkulären Dünndarmmuskulatur im Ruhezustand und unter dem Einfluss von 10^{-6} M Nifedipin zwischen Wildtypmaus links und CB ₁ ^{-/-} Maus rechts.....	35
Abbildung 18: Graphische Darstellung des Dünndarmtransits der Wildtyp-Maus im Vergleich zur CB ₁ -Knockout-Maus. Der Transit der Markersubstanz ist dabei in Verhältnis zur Gesamtlänge des Darmes gesetzt worden. Es zeigt sich eine	

signifikante Beschleunigung der Dünndarmpassage im Vergleich zur Wildtyp-Maus (*p<0,05)	37
Abbildung 19: Neurone des enteralen Nervensystems. Einteilung nach Dogiel in Typ I bis III. Alle Populationen sind im Plexus myentericus und submucosus vorhanden (67).....	41
Abbildung 20: Elektrisches Verhalten enteraler Nervenzellen. Differenzierung der Neurone in ein (A) S / Typ 1 Neuron, das nach Depolarisation repetitiv Aktionspotentiale feuern kann, und (B) AH/Typ 2 Neuron, das nach einem Aktionspotential eine lange Nachhyperpolarisation zeigt (210).....	42
Abbildung 21: Räumliche Anordnung der ICC.....	44
Abbildung 22: Enterales Nervensystem. Der Plexus myentericus befindet sich zwischen der Längs- und Zirkulärmuskulatur des Magen-Darm-Trakts. Der Plexus submucosus ist zwischen Zirkulärmuskulatur und Mucosa lokalisiert (79)	47
Abbildung 23: Strukturformeln von ausgewählten natürlichen Cannabinoiden (101)	53
Abbildung 24: Links dargestellt die Strukturformeln von bi-/trizyklischen synthetischen nicht-klassischen Cannabinoiden. Rechts die Strukturformeln der Aminoalkylinole (101)	54
Abbildung 25: Strukturformeln der endogenen Cannabinoide (55)	55
Abbildung 26: Aufgeführt sind schematisch die Stoffwechselvorgänge des Endocannabinoid-Metabolismus und Möglichkeiten der pharmakologischen Beeinflussung.....	57
Abbildung 27: Oben Strukturformeln der Diazylpyrazole mit antagonistischer Wirkung an den CB-Rezeptoren. Unten eine weitere chemische Substanz mit antagonistischer Wirkung jedoch nicht zu den Diazylpyrazole gehörend (101).....	58

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Einfluss von Anandamid auf die Höhe und Fläche der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.)	20
Tabelle 2: Einfluss von Anandamid auf die Latenz der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.).	22
Tabelle 3: Einfluss von AM251 auf die Höhe und Fläche der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.).	24
Tabelle 4: Einfluss von AM251 auf Latenz der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentration. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.).	26
Tabelle 5: Einfluss von Anandamid auf die Höhe und Fläche der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentration. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.)	28
Tabelle 6: Einfluss von Anandamid auf Latenz der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.)	30
Tabelle 7 : Einfluss von AM251 auf die Höhe und Fläche der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigenden Konzentrationen. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.)	32
Tabelle 8: Einfluss von AM251 auf Latenz der aszendierenden Kontraktion in kumulativ steigender Konzentration. Angegeben ist der Mittelwert als prozentualer Anteil zum Nullwert mit Standardabweichung (S.E.M.)	34
Tabelle 9: Zusammenfassung der Daten des Transitversuches	38
Tabelle 10: Übersicht von verschiedenen Zelllinien an denen eine intrazelluläre Aufnahme von Anandamid nachgewiesen werden konnte.....	56
Tabelle 11: Ausgewählte Übersicht über Cannabinoide und ihre direkten und indirekten Antagonisten (21;55;101;128;148).....	59

Tabelle 12: Übersicht von Studien, in denen Interaktionen von Cannabinoiden mit Ca²⁺ Kanälen beschrieben wurden.	72
---	-----------

10 REFERENZEN

1. Adami M, Frati P, Bertini S, Kulkarni-Narla A, Brown DR, de Caro G, Coruzzi G, Soldani G. Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 1598-606.
2. Adams IB, Martin BR. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* 1996; 91: 1585-614.
3. Al Hayani A, Davies SN. Cannabinoid receptor mediated inhibition of excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal slice is developmentally regulated. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 663-5.
4. Anavi-Goffer S, Irving A, Pertwee R. The cellular distribution of CB1 receptors in the myenteric plexus. *Symposium on the Cannabinoids*, Burlington, Vermont 2000; 2000:1.
5. Arnone M, Maruani J, Chaperon F, Thiebot MH, Poncelet M, Soubrie P, Le Fur G. Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; 132: 104-6.
6. Auerbach L. Über einen Plexus gangliosis myogastricus. 39er Jahr-Bericht u Abh d Schlesischen Gesellsch f Vaterländ Cult 1862; 103-4.
7. Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, Khanolkar A, Layward L, Fezza F, Bisogno T, Di M, V. Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J* 2001; 15: 300-2.
8. Baker D, Pryce G, Croxford JL, et al. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* 2002; 404: 84-7.
9. Barajas-Lopez C, Berezin I, Daniel EE, Huizinga JD. Pacemaker activity recorded in interstitial cells of Cajal of the gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 1989; 257: C830-C835.
10. Bayliss WM, Starling EH. The movements and innervation of the large intestine. *J Physiol (Lond)* 1900; 26: 107-18.
11. Beltramo M, Piomelli D. Anandamide transport inhibition by the vanilloid agonist olvanil. *Eur J Pharmacol* 1999; 364: 75-8.
12. Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 1997; 277: 1094-7.
13. Biegon A, Kerman IA. Autoradiographic study of pre- and postnatal distribution of cannabinoid receptors in human brain. *Neuroimage* 2001; 14: 1463-8.
14. Bisogno T, Maurelli S, Melck D, De Petrocellis L, Di M, V. Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 3315-23.

15. Black SC. Cannabinoid receptor antagonists and obesity. *Curr Opin Investig Drugs* 2004; 5: 389-94.
16. Bouaboula M, Perrachon S, Milligan L, Canat X, Rinaldi-Carmona M, Portier M, Barth F, Calandra B, Pecceu F, Lupker J, Maffrand JP, Le Fur G, Casellas P. A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J Biol Chem* 1997; 272: 22330-9.
17. Brookes SJ, Song ZM, Steele PA, Costa M. Identification of motor neurons to the longitudinal muscle of the guinea pig ileum. *GE* 1992; 103: 961-73.
18. Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neurosci* 1998; 82: 1131-49.
19. Burdyga G, Lal S, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ. Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. *J Neurosci* 2004; 24: 2708-15.
20. Burns AJ, Herbert TM, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastrointestinal tract as revealed by c-Kit immunohistochemistry. *Cell Tissue Res* 1997; 290: 11-20.
21. Burstein SH, Karst M, Schneider U, Zurier RB. Ajulemic acid: A novel cannabinoid produces analgesia without a "high". *Life Sci* 2004; 75: 1513-22.
22. Cabral GA, Dove Pettit DA. Drugs and immunity: cannabinoids and their role in decreased resistance to infectious disease. *J Neuroimmunol* 1998; 83: 116-23.
23. Cajal SR. Sur les ganglions et plexus nerveux d'intestin. *C R Soc Biol (Paris)* 1893; 5: 217-23.
24. Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 1998; 394: 277-81.
25. Calignano A, La Rana G, Makriyannis A, Lin SY, Beltramo M, Piomelli D. Inhibition of intestinal motility by anandamide, an endogenous cannabinoid. *Eur J Pharmacol* 1997; 340: R7-R8.
26. Camilleri M. Treating irritable bowel syndrome: overview, perspective and future therapies. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 1237-48.
27. Casu MA, Porcella A, Ruiu S, Saba P, Marchese G, Carai MA, Reali R, Gessa GL, Pani L. Differential distribution of functional cannabinoid CB1 receptors in the mouse gastroenteric tract. *Eur J Pharmacol* 2003; 459: 97-105.
28. Caulfield MP, Brown DA. Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br J Pharmacol* 1992; 106: 231-2.

29. Chakrabarti A, Onaivi ES, Chaudhuri G. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein. *DNA Seq* 1995; 5: 385-8.
30. Chang IY, Glasgow NJ, Takayama I, Horiguchi K, Sanders KM, Ward SM. Loss of interstitial cells of Cajal and development of electrical dysfunction in murine small bowel obstruction. *J Physiol* 2001; 536: 555-68.
31. Cheung DW, Daniel EE. Comparative study of the smooth muscle layers of the rabbit duodenum. *J Physiol* 1980; 309:13-27.: 13-27.
32. Christopoulos A, Coles P, Lay L, Lew MJ, Angus JA. Pharmacological analysis of cannabinoid receptor activity in the rat vas deferens. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1281-91.
33. Colombo G, Agabio R, Diaz G, Lobina C, Reali R, Gessa GL. Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci* 1998; 63: L113-L117.
34. Colombo G, Agabio R, Lobina C. Cannabinoid modulation of intestinal propulsion in mice. *Eur J Pharmacol* 1998; 344: 67-9.
35. Compton DR, Gold LH, Ward SJ, Balster RL, Martin BR. Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263: 1118-26.
36. Cornelissen WB, de Laet AB, Kroese AB, Adriaensen DW, Van Bogaert PP, Scheuermann DW, Timmermans JP. Species-dependent features of Dogiel type II neurones in the mammalian enteric nervous system. *Eur J Morphol* 1999; 37: 241-9.
37. Cosenza M, Gifford AN, Gatley SJ, Pyatt B, Liu Q, Makriyannis A, Volkow ND. Locomotor activity and occupancy of brain cannabinoid CB1 receptors by the antagonist/inverse agonist AM281. *Synapse* 2000; 38: 477-82.
38. Cossu G, Ledent C, Fattore L, Imperato A, Bohme GA, Parmentier M, Fratta W. Cannabinoid CB1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse. *Behav Brain Res* 2001; 118: 61-5.
39. Costa M, Brookes SJ, Waterman S, Mayo R. Enteric neuronal circuitry and transmitters controlling intestinal motor function. In: Holle GE, Wood JD, eds. *Advances in the innervation of the gastrointestinal tract*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992;115-24.
40. Costa M, Furness JB. The peristaltic reflex: an analysis of the nerve pathways and their pharmacology. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1976; 294: 47-60.
41. Costa M, Furness JB, Humphreys CM. Apamin distinguishes two types of relaxation mediated by enteric nerves in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986; 332: 79-88.

42. Costa M, Furness JB, McLean JR. The presence of aromatic L-amino acid decarboxylase in certain intestinal nerve cells. *Histochem* 1976; 48: 129-43.
43. Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 2003; 112: 423-31.
44. Coutts AA, Brewster N, Innis T. Comparison of novel cannabinoid partial agonist and SR141716A in the guinea pig small intestine. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 645-52.
45. Coutts AA, Irving AJ, Mackie K, Pertwee RG, Anavi-Goffer S. Localisation of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. *J Comp Neurol* 2002; 448: 410-22.
46. Coutts AA, Pertwee RG. Inhibition by cannabinoid receptor agonists of acetylcholine release from the guinea pig myenteric plexus. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 66.
47. Cravatt BF, Demarest K, Lichtman AH, et.al. Supersensitivity to Anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signalling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9371-6.
48. Crist JR, He XD. Noncholinergic membrane potential responses to transmural nerve stimulation in the guinea pig ileum. *Am J Physiol* 1991; 260: G240-G249.
49. Croci T, Manara L, Aureggi G, Guagnini F, Rinaldi-Carmona M, Maffrand JP, Le Fur G, Mukenge S, Ferla G. In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 1393-5.
50. Daniel EE, Thomas J, Ramnarain M, Bowes TJ, Jury J. Do gap junctions couple interstitial cells of Cajal pacing and neurotransmission to gastrointestinal smooth muscle? *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13: 297-307.
51. Daniel EE, Wang YF. Gap junctions in intestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 309-20.
52. Daniel EE, Wang YF, Cayabyab FS. Role of gap junctions in structural arrangements of interstitial cells of Cajal and canine ileal smooth muscle. *Am J Physiol* 1998; 274: G1125-G1141.
53. Darmani NA. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR 141716A reverses the antiemetic and motor depressant actions of WIN 55, 212-2. *Eur J Pharmacol* 2001; 430: 49-58.
54. De Marchi N, De Petrocellis L, Orlando P, Daniele F, Fezza F, Di Giacomo B. Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia. *Lipids Health Dis* 2003; 2(1): 5.

55. De Petrocellis L, Cascio MG, Di M, V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 765-74.
56. De Ponti F, D'Angelo L, Frigo GM, Crema A. Inhibitory effects of calcium channel blockers on intestinal motility in the dog. *Eur J Pharmacol* 1989; 168: 133-44.
57. Desarnaud F, Cadas H, Piomelli D. Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization. *J Biol Chem* 1995; 270: 6030-5.
58. Deutsch DG, Chin SA. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 791-6.
59. Deutsch DG, Uneyama J. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66: 201-10.
60. Devane WA, Hanus L, Breuer A. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258: 1646-9.
61. Dewey WL, Harris LS, Kennedy JS. Some pharmacological and toxicological effects of 1-trans-delta8- and 1-trans-delta9-tetrahydrocannabinol in laboratory rodents. *Arch Int Pharmacodyn* 1972; 26: 136-7.
62. Dewey WL, Kennedy AL, Howes JF. Some autonomic, gastrointestinal and metabolic effects of two constituents of marijuana. *Fed Proc* 1970; 29: 650.
63. Di M, V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 1994; 372: 686-91.
64. Di M, V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001; 410: 822-5.
65. Dickens EJ, Edwards FR, Hirst GD. Selective knockout of intramuscular interstitial cells reveals their role in the generation of slow waves in mouse stomach. *J Physiol* 2001; 531: 827-33.
66. Dinh TP, Freund TF, Piomelli D. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids* 2002; 121: 149-58.
67. Dogiel AS. Über den Bau der Ganglien in den Flechten des Darms und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. *Arch Anat Physiol Anat* 1899; 130-58.
68. Dunn M, Davis R. The perceived effects of marijuana on spinal cord injured males. *Paraplegia* 1974; 12: 175.
69. Egertova M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1998; 265: 2081-5.

70. Ekblad E, Sjuve R, Arner A, Sundler F. Enteric neuronal plasticity and a reduced number of interstitial cells of Cajal in hypertrophic rat ileum. *Gut* 1998; 42: 836-44.
71. Fattore L, Martellotta MC, Cossu G, Mascia MS, Fratta W. CB1 cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases intravenous cocaine self-administration in rats. *Behav Brain Res* 1999; 104: 141-6.
72. Faussonne-Pellegrini MS, Pantalone D, Cortesini C. Smooth muscle cells, interstitial cells of Cajal and myenteric plexus interrelationships in the human colon. *Acta Anat (Basel)* 1990; 139: 31-44.
73. Fegley D, Kathuria S, Mercier R, Li C, Goutopoulos A, Makriyannis A. Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004.
74. Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Glass M, Mackie KP, Fahey KJ, Cullinan GJ, Hunden DC, Johnson DW, Chaney MO, Koppel GA, Brownstein M. LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 291-7.
75. Fezza F, Bisogno T, Minassi A, Appendino G. Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues. *FEBS Lett* 2002; 513: 294-8.
76. Fowler CJ, Jacobsson SO. Cellular transport of anandamide, 2-arachidonoylglycerol and palmitoylethanolamide--targets for drug development? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66: 193-200.
77. Fritzsche M. Are cannabinoid receptor knockout mice animal models for schizophrenia? *Med Hypotheses* 2001; 56: 638-43.
78. Furness JB, Bornstein JC, Kunze WA, Bertrand PP, Kelly H, Thomas EA. Experimental basis for realistic large-scale computer simulation of the enteric nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996; 23: 786-92.
79. Furness JB, Costa M. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neurosci* 1980; 5: 1-20.
80. Gabella G. Development of smooth muscle: ultrastructural study of the chick embryo gizzard. *Anat Embryol (Berl)* 1989; 180: 213-26.
81. Gabella G. Intramural neurons in the urinary bladder of the guinea-pig. *Cell Tissue Res* 1990; 261: 231-7.
82. Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol* 1999; 276: H2085-H2093.
83. Gerard C, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 7142.

84. Gerard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 1991; 279 (Pt 1): 129-34.
85. Gessa GL, Mascia MS, Casu MA, Carta G. Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A. *Eur J Pharmacol* 1997; 327: R1-R2.
86. Gifford AN, Tang Y, Gatley SJ, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A. Effect of the cannabinoid receptor SPECT agent, AM 281, on hippocampal acetylcholine release from rat brain slices. *Neurosci Lett* 1997; 238: 84-6.
87. Glass M, Dragunow M, Faull RL. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neurosci* 1997; 77: 299-318.
88. Gralla RA. Cannabinoids and the control fo chemotherapy-induced nausea and vomiting. In: Nahas G, Sutin K, Harvey DJ, et al., eds. *Marijuana and Medicine*. Human Press, Totowa, NJ, 1999.
89. Grinspoon L, Bakalar JB. *Marihuana-the forbidden medicine*. Yale University Press, 1997.
90. Hanani M, Freund HR. Interstitial cells of Cajal--their role in pacing and signal transmission in the digestive system. *Acta Physiol Scand* 2000; 170: 177-90.
91. Harrold JA, Elliott JC, King PJ, Widdowson PS, Williams G. Down-regulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food? *Brain Res* 2002; 952: 232-8.
92. Heinemann A, Shahbazian A, Holzer P. Cannabinoid inhibition of guinea-pig intestinal peristalsis via inhibition of excitatory and activation of inhibitory neural pathways. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1289-97.
93. Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, De Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 1991; 11: 563-83.
94. Hildebrandt AL, Kelly-Sullivan DM, Black SC. Antiobesity effects of chronic cannabinoid CB1 receptor antagonist treatment in diet-induced obese mice. *Eur J Pharmacol* 2003; 462: 125-32.
95. Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahan A, Campbell WB. Accumulation of N-arachidonoyl ethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem* 1997; 69: 631-8.
96. Hille B. *Ionic channels in excitable membranes*. Sinauer, Sunderland, 1992.
97. Hillsley K, Schemann M, Grundy D. Alpha-adrenoreceptor modulation of neurally evoked circular muscle responses of the guinea pig stomach. *J Auton Nerv Syst* 1992; 40: 57-62.

98. Hirst GDS, McKirdy HC. A nervous mechanism for descending inhibition in guinea-pig small intestine. *J Physiol (Lond)* 1974; 238: 129-43.
99. Hohmann AG. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids* 2002; 121: 173-90.
100. Hollister LE. Health aspects of cannabis. *Pharmacol Rev* 1986; 38: 1-20.
101. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 161-202.
102. Huang CC, Chen YL, Lo SW, Hsu KS. Activation of cAMP-dependent protein kinase suppresses the presynaptic cannabinoid inhibition of glutamatergic transmission at corticostriatal synapses. *Mol Pharmacol* 2002; 61: 578-85.
103. Huang CC, Lo SW, Hsu KS. Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J Physiol* 2001; 532: 731-48.
104. Huestis MA, Gorelick DA, Heishman SJ, Preston KL, Nelson RA, Moolchan ET, Frank RA. Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 322-8.
105. Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunos G. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 2023-8.
106. Izzo AA, Mascolo N, Pinto L. Modulation of peristalsis by cannabinoid CB1 ligands in the isolated guinea pig ileum. *Eur J Pharmacol* 1999; 384: 37-42.
107. Izzo AA, Mascolo N, Borrelli F. Defaecation, intestinal fluid accumulation and motility in rodents: implication of cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999; 359: 65-70.
108. Izzo AA, Mascolo N, Borrelli F, Capasso F. Excitatory transmission to the circular muscle of the guinea-pig ileum: evidence for the involvement of cannabinoid CB1 receptors. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 1363-8.
109. Izzo AA, Mascolo N, Capasso F. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 597-603.
110. Izzo AA, Pinto L, Borrelli F. Central and peripheral cannabinoid modulation of gastrointestinal transit in physiological states or during the diarrhoea induced by croton oil. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 1627-32.
111. Jain AK, Ryan JR, McMahon FH, Smith G. Evaluation of intramuscular levonanatradol and placebo in acute postoperative pain. *J Clin Pharmacol* 1981; 21: 320s-6s.

112. Jamshidi N, Taylor DA. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 1151-4.
113. Johnson MR, Melvin LS, Althuis TH, Bindra JS, Harbert CA, Milne GM, Weissman A. Selective and potent analgetics derived from cannabinoids. *J Clin Pharmacol* 1981; 21: 271S-82S.
114. Katayama K, Ueda N, Kurahashi Y, Suzuki H, Yamamoto S, Kato I. Distribution of anandamide amidohydrolase in rat tissues with special reference to small intestine. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1347: 212-8.
115. Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 2003; 9: 76-81.
116. Katona I, Sperlagh B, Magloczky Z, Santha E, Kofalvi A, Czirjak S, Mackie K, Vizi ES, Freund TF. GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neurosci* 2000; 100: 797-804.
117. Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kofalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 1999; 19: 4544-58.
118. Kito Y, Ward SM, Sanders KM. Pacemaker potentials generated by interstitial cells of Cajal in the murine intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004.
119. Komuro T. Comparative morphology of interstitial cells of Cajal: ultrastructural characterization. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 267-85.
120. Kulkarni-Narla A, Brown DR. Localization of CB1-cannabinoid receptor immunoreactivity in the porcine enteric nervous system. *Cell Tissue Res* 2000; 302: 73-80.
121. Kulkarni-Narla A, Brown DR. Opioid, cannabinoid and vanilloid receptor localization on porcine cultured myenteric neurons. *Neurosci Lett* 2001; 308: 153-6.
122. Kumar RN, Chambers WA, Pertwee RG. Pharmacological actions and therapeutic uses of cannabis and cannabinoids. *Anaesthesia* 2001; 56: 1059-68.
123. Landsman RS, Makriyannis A, Deng H, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI. AM630 is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. *Life Sci* 1998; 62: L109-L113.
124. Langley JN, Anderson H.K. The innervation of the pelvic and adjoining viscera.IV. The internal generative organs. *J Physiol Lond* 1895; 19: 122-30.
125. Lastres-Becker I, Hansen HH, Berrendero F, de Miguel R, Perez-Rosado A, Manzanares J, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J. Alleviation of motor hyperactivity

- and neurochemical deficits by endocannabinoid uptake inhibition in a rat model of Huntington's disease. *Synapse* 2002; 44: 23-35.
126. Le Fur G, Arnone M, Rinaldi-Carmona M, Barth M, Heshmati H. SR141716, a selective antagonist of CB1 receptors and obesity. *Symposium on the Cannabinoids*, El Escorial, Spain 2001; 101.
 127. Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitot F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *S* 1999; 283: 401-4.
 128. Lichtman AH, Leung D, Shelton CC, Saghatelian A, Hardouin C, Boger DL, Cravatt BF. Reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase that promote analgesia: evidence for an unprecedented combination of potency and selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 441-8.
 129. Ligresti A, Morera E, Van Der SM, Monory K, Lutz B, Ortar G, Di M, V. Further evidence for the existence of a specific process for the membrane transport of anandamide. *Biochem J* 2004; 380: 265-72.
 130. Lopez-Redondo F, Lees GM, Pertwee RG. Effects of cannabinoid receptor ligands on electrophysiological properties of myenteric neurones of the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 330-4.
 131. Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di M, V, Finazzi-Agro A. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem* 2000; 275: 13484-92.
 132. Maccarrone M, Van Der SM, Rossi A, Veldink GA, Vliegthart JF, Agro AF. Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *J Biol Chem* 1998; 273: 32332-9.
 133. Mackie K, Hille B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3825-9.
 134. Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 1995; 15: 6552-61.
 135. MacLennan SJ, Reynen PH, Kwan J, Bonhaus DW. Evidence for inverse agonism of SR141716A at human recombinant cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 619-22.
 136. Maejima T, Hashimoto K, Yoshida T, Aiba A, Kano M. Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* 2001; 31: 463-75.
 137. Maggi CA, Giuliani S. Multiple inhibitory mechanisms mediate non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the circular muscle of the guinea pig colon. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1993; 347: 630-47.

138. Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. Dopaminergic regulation of cannabinoid receptor mRNA levels in the rat caudate-putamen: an in situ hybridization study. *J Neurochem* 1993; 61: 1705-12.
139. Manara L, Landi M, Croci T. Delay of gastric emptying and gastrointestinal transit by stimulation of intestinal cannabinoid CB1 receptors. *FASEB J* 2000; 14: 785.
140. Mang CF, Erbelding D, Kilbinger H. Differential effects of anandamide on acetylcholine release in the guinea-pig ileum mediated via vanilloid and non-CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 161-7.
141. Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgansberger W, Di M, V, Lutz B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 2002; 418: 530-4.
142. Martin BR. Cellular effects of cannabinoids. *Pharmacol Rev* 1986; 38: 45-74.
143. Mascolo N, Izzo AA, Ligresti A, Costagliola A, Pinto L, Cascio MG, Maffia P, Cecio A, Capasso F, Di M, V. The endocannabinoid system and the molecular basis of paralytic ileus in mice. *FASEB J* 2002; 16: 1973-5.
144. Massa F, Marsicano G, Hermann H, Cannich A, Monory K, Cravatt BF, Ferri GL, Sibaev A, Storr M, Lutz B. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J Clin Invest* 2004; 113: 1202-9.
145. Mathison R, Ho W, Pittman QJ, Davison JS, Sharkey KA. Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 1247-54.
146. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346: 561-4.
147. McConalogue K, Furness JB. Gastrointestinal neurotransmitters. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1994; 8: 51-76.
148. McFarland MJ, Barker EL. Anandamide transport. *Pharmacol Ther* 2004; 104: 117-35.
149. Mechoulam R. Marijuana chemistry. *S* 1970; 168: 1159-66.
150. Mechoulam R. The pharmacohistory of *Cannabis sativa*. *CRC. Cannabinoids as therapeutic agents*. Press: Boca Raton, 1986; 1-19.
151. Mechoulam R, Ben Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 83-90.
152. Mechoulam R, Braun P, Gaoni Y. Syntheses of 1-tetrahydrocannabinol and related cannabinoids. *J Am Chem Soc* 1972; 94: 6159-65.

153. Mechoulam R, Goani Y. The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett* 1982; 12: 1109-11.
154. Merritt JC, Crawford WJ, Alexander PC, Anduze AL, Gelbart SS. Effect of marihuana on intraocular and blood pressure in glaucoma. *Ophthalmology* 1980; 87: 222-8.
155. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365: 61-5.
156. Nishi S, North RA. Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *J Physiol* 1973; 231: 471-91.
157. Noyes R, Jr., Brunk SF, Avery DA, Canter AC. The analgesic properties of delta-9-tetrahydrocannabinol and codeine. *Clin Pharmacol Ther* 1975; 18: 84-9.
158. Noyes R, Brunk SF, Baram DA, Canter A. The analgesic properties of delta-9-tetrahydrocannabinol. *J Clin Pharmacol* 1975; 15: 139-43.
159. Ortar G, Ligresti A, De Petrocellis L, Morera E, Di M, V. Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 1473-81.
160. Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 1999; 6: 635-64.
161. Pertwee RG. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 2001; 63: 569-611.
162. Pertwee RG. Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 2001; 48: 859-67.
163. Pertwee RG, Fernando SR, Griffin G, Abadji V, Makriyannis A. Effect of phenylmethylsulphonyl fluoride on the potency of anandamide as an inhibitor of electrically evoked contractions in two isolated tissue preparations. *Eur J Pharmacol* 1995; 272: 73-8.
164. Pertwee RG, Fernando SR, Nash JE. Further evidence for the presence of cannabinoid CB-1 receptors agonists of acetylcholine release from the guinea pig myenteric plexus. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 2199-205.
165. Pinto L, Capasso R, Di Carlo G, Izzo AA. Endocannabinoids and the gut. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66: 333-41.
166. Pinto L, Izzo AA, Cascio MG, Bisogno T, Hospodar-Scott K, Brown DR, Mascolo N, Di M, V, Capasso F. Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. *GE* 2002; 123: 227-34.
167. Porter AC, Felder CC. The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 2001; 90: 45-60.

168. Quinson N, Robbins HL, Clark MJ, Furness JB. Calbindin immunoreactivity of enteric neurons in the guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res* 2001; 305: 3-9.
169. Ravinet TC, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, Soubrie P. Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R345-R353.
170. Reibaud M, Obinu MC, Ledent C, Parmentier M, Bohme GA, Imperato A. Enhancement of memory in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice. *Eur J Pharmacol* 1999; 379: R1-R2.
171. Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 1994; 350: 240-4.
172. Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, Oustric D, Sarran M, Bouaboula M, Calandra B, Portier M, Shire D, Breliere JC, Le Fur GL. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 644-50.
173. Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 790-801.
174. Ross RA, Brockie HC, Stevenson LA, Murphy VL, Templeton F, Makriyannis A, Pertwee RG. Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 665-72.
175. Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *GE* 1996; 111: 492-515.
176. Sanders KM, Smith TK. Enteric neural regulation of slow waves in circular muscle of the canine proximal colon. *J Physiol* 1986; 377: 297-313.
177. Schemann M, Grundy D. Electrophysiological identification of vagally innervated enteric neurons in guinea pig stomach. *Am J Physiol* 1992; 263: G709-G718.
178. Schuel H, Chang MC, Berkery D, Schuel R, Zimmerman AM, Zimmerman S. Cannabinoids inhibit fertilization in sea urchins by reducing the fertilizing capacity of sperm. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 40: 609-15.
179. Shook JE, Burks TF. Psychoactive cannabinoids reduce gastrointestinal propulsion and motility in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 249: 444-9.
180. Sim-Selley LJ, Brunk LK, Selley DE. Inhibitory effects of SR141716A on G-protein activation in rat brain. *Eur J Pharmacol* 2001; 414: 135-43.
181. Simiand J, Keane M, Keane PE, Soubrie P. SR 141716, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, selectively reduces sweet food intake in marmoset. *Behav Pharmacol* 1998; 9: 179-81.

182. Simoneau II, Hamza MS, Mata HP, Siegel EM, Vanderah TW, Porreca F, Makriyannis A, Malan TP, Jr. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 suppresses opioid-induced emesis in ferrets. *Anesthesiology* 2001; 94: 882-7.
183. Smith TK, Robertson WJ. Synchronous movements of the longitudinal and circular muscle during peristalsis in the isolated guinea-pig distal colon. *J Physiol* 1998; 506: 563-77.
184. Spencer N, McCarron SL, Smith TK. Sympathetic inhibition of ascending and descending interneurons during the peristaltic reflex in the isolated guinea-pig distal colon. *J Physiol* 1999; 519 Pt 2:539-50.: 539-50.
185. Stach W. The neuronal organization of the plexus myentericus (Auerbach) in the small intestine of the pig Type II-Neurone. *Z Mikrosk Anat Forschung* 1981; 95: 161-82.
186. Steiner H, Bonner TI, Zimmer AM, Kitai ST, Zimmer A. Altered gene expression in striatal projection neurons in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5786-90.
187. Stevens RJ, Publicover NG, Smith TK. Induction and organization of Ca²⁺ waves by enteric neural reflexes. *Nature* 1999; 399: 62-6.
188. Storr M, Gaffal E, Saur D, Schusdziarra V, Allescher HD. Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 67-76.
189. Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66: 173-92.
190. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Tonegawa T, Nakane S, Yamashita A, Waku K. Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca(2+)-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218: 113-7.
191. Suzuki N, Prosser CL, Dahms V. Boundary cells between longitudinal and circular layers: essential for electrical slow waves in cat intestine. *Am J Physiol* 1986; 250: G287-G294.
192. Tashkin DP, Shapiro BJ, Frank IM. Acute effects of marihuana on airway dynapics in spontaneously and experimentally produced bronchial asthma. *The Pharmacology of Marihuana*. 1976;84-92.
193. Taxi J. Morphological and cytochemical studies on the synapses in the autonomic nervous system. *Prog Brain Res* 1969; 31: 5-20.
194. Thuneberg L, Peters S. Toward a concept of stretch-coupling in smooth muscle. I. Anatomy of intestinal segmentation and sleeve contractions. *Anat Rec* 2001; 262: 110-24.

195. Tonini M, Candura M, Onori L, Coccini T, Manzo L, Rizzi CA. 5-Hydroxytryptamine₄ receptor agonists facilitate cholinergic transmission in the circular muscle of guinea pig ileum: antagonism by tropisetron and DAU 6285. *Life Sci* 1992; 50: PL173-PL178.
196. Tramer MR, Carroll D, Campbell FA, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review. *Br Med J* 2001; 323: 16-21.
197. Turner CE. Marihuana and cannabis: research why the conflict. In: Harvey DJ, ed. *Marihuana*. IRL Press Oxford, 1985;31-36.
198. Ueda N, Puffenberger RA, Yamamoto S, Deutsch DG. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chem Phys Lipids* 2000; 108: 107-21.
199. Van Sickle MD, Oland LD, Ho W, Hillard CJ, Mackie K, Davison JS, Sharkey KA. Cannabinoids inhibit emesis through CB1 receptors in the brainstem of the ferret. *GE* 2001; 121: 767-74.
200. Vannucchi MG. Receptors in interstitial cells of Cajal: identification and possible physiological roles. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 325-35.
201. Walker JM, Huang SM. Cannabinoid analgesia. *Pharmacol Ther* 2002; 95: 127-35.
202. Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 247-56.
203. Ward SM, Beckett EA, Wang X, Baker F, Khoyi M, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci* 2000; 20: 1393-403.
204. Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *Anat Rec* 2001; 262: 125-35.
205. Watson MJ, Lang RJ, Bywater RA, Taylor GS. Characterization of the membrane conductance changes underlying the apamin-resistant NANC inhibitory junction potential in the guinea-pig proximal and distal colon. *J Auton Nerv Syst* 1996; 60: 31-42.
206. Williams CM, Kirkham TC. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 1999; 143: 315-7.
207. Wilson RI, Kunos G, Nicoll RA. Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron* 2001; 31: 453-62.
208. Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. *S* 2002; 296: 678-82.

-
209. Wood JD. Neurophysiology of the enteric nervous system. In: Brooks C, Sato A, eds. Integrative functions of the autonomic nervous system. Tokio: University of Tokio Press, 1979;177-93.
 210. Wood JD. Application of classification schemes to the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 1994; 48: 17-29.
 211. Yal WM, Reese L. Cannabinoid receptor: inhibition of ACh release from myenteric plexus of small intestine. *Gastroenterology* 1999; 116: G4791.
 212. Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5780-5.
 213. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di M, V, Julius D, Hogestatt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999; 400: 452-7.

11 LEBENS LAUF

Anschrift: Grimmstr. 4, 80336 München

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 27.10.1976

Geburtsort: Heidelberg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

09/83 - 06/87 Grund- und Hauptschule Baiertal

09/87 - 06/96 Gymnasium Wiesloch Allgemeine Hochschulreife

11/96 – 09/98 LMU München, Studium der Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt

04/99 - 10/03 Technischen Universität München, Studium der Humanmedizin, klinischer Abschnitt

Praktisches Jahr

10/02 - 01/03 Klinikum Straubing Anästhesie, PD Dr. med. H. Vogel

02/03 - 05/03 Klinikum Rechts der Isar, München
Innere Medizin: Gastroenterologie Prof. Dr. Schmid,
Kardiologie Prof. Dr. A. Schömig

06/03 - 09/03 Klinikum Rechts der Isar, München
Chirurgie, Univ.-Prof. Dr. J.R. Siewert

Berufliche Tätigkeiten

07/04 - 09/04 Arzt im Praktikum, II. Medizinische Klinik, Klinikum Großhadern, LMU München, Prof. Dr. med. B. Göke

seit 10/04 Assistenzarzt, II. Medizinische Klinik, Klinikum Großhadern, LMU München, Prof. Dr. med. B. Göke

12 DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. H.D. Allescher, der mir den Einstieg in die experimentelle Forschung im Bereich der Neurogastroenterologie ermöglichte. Durch seine begeisternde Art in Forschung und Lehre war er stets Vorbild und Mentor. Dr. med. M. Storr danke ich für seine enge Betreuung der Doktorarbeit und seine brillianten Ideen.

Ganz besonders möchte ich auch Prof. Dr. med. B. Göke danken, der es mir ermöglicht in diesem faszinierenden und prosperierenden Gebiet weiterzuforschen. Zuletzt geht mein herzlichster Dank an meine Familie, die mir stets den Raum zum Beschreiten meines Lebensweges gelassen hat und mich in allen Situationen finanziell und mental unterstützte.